N° d'ordre : 312

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Claude CASSAGNE

INGÉNIEUR-CHIMISTE E. N. S. C. B.

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

MAÎTRE-ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

Les hydrocarbures végétaux : biosynthèse et localisation cellulaire.

Soutenue le 19 décembre 1970, devant la Commission d'Examen :

MM. J. VALADE, Doyen ..... *Président.*

P. MAZLIAK, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris .....
J. BARAUD, Professeur .....
A. LUTZ, Professeur ..... } *Examinateurs.*

— 1970 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543528_0004

N° d'ordre : 312

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Claude CASSAGNE

INGÉNIEUR-CHIMISTE E. N. S. C. B.

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

MAÎTRE-ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

Les hydrocarbures végétaux : biosynthèse et localisation cellulaire.

Soutenue le 19 décembre 1970, devant la Commission d'Examen :

MM. J. VALADE, Doyen ..... *Président.*

P. MAZLIAK, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris .....
J. BARAUD, Professeur .....
A. LUTZ, Professeur ..... } *Examinateurs.*

— 1970 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITÉ
DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

351, COURS DE LA LIBÉRATION - TALENCE (GIRONDE)
TÉL. BORDEAUX (56) 92.92.81

Doyens honoraires : M. BRUS
M. CALAS

Doyen : M. VALADE

Professeurs honoraires :

M. KASTLER	Professeur à la Sorbonne
M. PISOT	Professeur à la Sorbonne
Mlle JOSIEN	Professeur à la Sorbonne
M. MILLOUX	
M. CAU	
M. GENEVOIS	

Professeurs :

M. ROGER	Mécanique rationnelle
M. WEILL	Anatomie comparée et embryogénie
M. DUFRESNOY	Mathématiques générales
M. LAFON	Physiologie générale
M. BOUNHIOL	Biologie animale
M. SERVANT	Physique
M. CALAS	Chimie organique
M. GAY	Cristallographie et minéralogie
M. PACAULT	Chimie Physique
M. DAVID	Physiologie végétale
M. BLAIZOT	Physiologie de la nutrition
M. COLMEZ	Méthodes mathématiques de la physique
M. CAMBAR	Biologie animale
M. VIGNEAUX	Géologie
M. PANOUSE	Zoologie
M. ARZELIES	Physique (détaché à la Faculté des Science du Maroc)
M. RIBEREAU-GAYON	Oenologie et chimie agricole
M. RISS	Mathématiques
M. HAGET	Zoologie expérimentale
M. CHASTEL	Physique nucléaire
M. HAGENMULLER	Chimie minérale
M. CREAC'H	Biologie animale
M. LOUDETTE	Mécanique physique
M. PATY	Chimie
M. BORDES	Préhistoire
M. SECHET	Botanique
M. BAGANAS	Mathématiques
M. VALENTIN	Radioélectricité
M. EYME	Botanique
M. RUAMPS	Physique électronique
M. FRAINNET	Chimie organique
M. HOARAU	Chimie physique
M. MARCHAND	Chimie
M. LALANDE	Chimie appliquée

M. GOTTIS	Géologie dynamique
M. LEMANCEAU	Chimie
M. CARDO	Psychophysiologie
M. ROCH	Physique
M. BELLON	Chimie (détaché à la Faculté des Science du Maroc)
M. CLASTRE	Cristallographie physique
M. JOUSSOT-DUBIEN	Chimie
M. VALADE	Chimie organique
M. SURDIN	Automatique
Mlle LAFFITTE	Physique
M. CLIN	Géologie
M. DESTRIAU	Chimie
M. BOTHOREL	Chimie
M. BLONDEL	Mathématiques
M. LOCHET	Physique
M. LASCOMBE	Chimie
M. RIMPAULT	Physique théorique
M. ANDRE	Zoologie et physiologie animale
M. AUROUZE	Hydrogéologie
M. HAUGAZEAU	Informatique
M. FRESNEL	Calcul infinitésimal
M. MURAOUR	Océanographie
M. SIMONOFF	Radiochimie
M. SOURISSEAU	Chimie
M. VINDT	Biologie végétale
M. REGNIER	Mathématiques
M. PETIT	Physique corpusculaire
M. BARAUD	Chimie biologique
M. EMBERGER	Géologie
M. CHARRU	Physique
M. BARETS	Biologie animale
M. PINEAU	Chimie
M. LEVEQUE	Géologie approfondie
M. BOUSSEAU	Physique
M. MENNRATH	Physique
M. BOUAS-LAURENT	Chimie organique
M. RIBEREAU-GAYON P	Chimie oenologique
Mlle DUTRIEU	Physiologie animale
M. MOYES	Géologie
M. BERNET	Génétique
M. LUTZ	Botanique
M. MOULINES	Chimie
M. POUCHARD	Chimie minérale
M. DRESS	Mathématiques
M. ARTOLA	Mathématiques
M. MENDES-FRANCE	Mathématiques
M. N.	Astronomie
M. N.	Physique générale
M. N.	Biochimie

Maître de conférences honoraire :

M. DE PUYMALY

Maîtres de conférences :

Mme PETIT	Physique
M. SARDOS	Physique
M. DUMERY	Mécanique
M. LESCA	Mathématiques
M. MARTINET	Mathématiques
M. BOUARD	Biologie végétale
M. MINNAERT	Physique théorique
M. ABGRALL	Physique théorique
M. DE MATHAN...suppléé par M. DAMEY	Mathématiques
M. BOISSEAU	Biologie générale
M. NASLAIN	Chimie minérale
M. ONILLON	Chimie minérale
M. HOGBE	Mathématiques
M. KLINGEBIEL	Géologie
M. BOUCHET	Informatique
M. GEORGES	Physique du solide
M. JOLY	Informatique
M. N.	Physique
M. N.	Biophysique

Conseiller Administratif :

M. LLORENS.....

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MONSIEUR JACQUES VALADE

Doyen de la Faculté des Sciences de Bordeaux

A MONSIEUR JACQUES BARAUD

Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie de la Faculté des Sciences de Bordeaux.

Qu'il me soit permis d'exprimer à Monsieur le Doyen VALADE, qui a bien voulu présider mon jury de thèse, le témoignage de ma profonde gratitude pour l'accueil bienveillant qu'il m'a toujours réservé. Son aide constante sur les plans humain et scientifique fut irremplaçable.

Monsieur le Professeur BARAUD m'a guidé et encouragé sans relâche tout au long de ce travail. Qu'il trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance tant pour la direction scientifique qu'il a assumée que pour les marques d'amitié et de confiance qu'il m'a toujours témoignées.

Monsieur le Professeur MAZLIAK a bien voulu accepter de venir juger mon travail : je lui exprime très respectueusement mes remerciements.

Je remercie Monsieur le Professeur LUTZ, membre de mon jury, de l'aide qu'il m'a apportée pour certaines expériences.

Je tiens également à remercier tous ceux qui au cours de ce travail ont su très souvent m'épauler et en particulier mes collègues Mademoiselle MAURICE et Monsieur LARROUQUERE : nos discussions amicales ont toujours été fructueuses.

Nombreux enfin sont ceux qui avec compétence et amabilité m'ont apporté leur concours tant en spectrométrie de masse, où je remercie Monsieur BOURGEOIS, Docteur ès-Sciences et l'Institut du Pin, qu'en comptage des activités par scintillation, où il me faut remercier Mademoiselle HARMAND et le service de Monsieur le Professeur BLANQUET et Monsieur SEVRAC et le service de Monsieur le Professeur LEVEQUE.

Certaines expériences réalisées dans la première partie de ce travail ont bénéficié de l'aide technique de Madame TANGUY : je la remercie bien sincèrement.

Enfin je ne saurais oublier tous les membres du laboratoire qui ont su créer et conserver l'esprit d'équipe qui y règne.

Messieurs BERNHARD et LEGLISE de la Station de la Grande Ferrade m'ont fourni le matériel végétal étudié dans la première partie : il m'est agréable de les en remercier.

LES HYDROCARBURES VÉGÉTAUX :

BIOSYNTHÈSE

ET LOCALISATION CELLULAIRE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Parmi les catégories moléculaires formant l'ensemble biochimique hétérogène des lipides, le groupe des hydrocarbures, à l'exception peut-être du squalène a été relativement négligé.

Cependant leur distribution est assez universelle dans les organismes.

Cela nous a conduit à entreprendre une étude systématique de la biosynthèse et de la répartition cellulaire des alcanes dans quelques organismes végétaux bien choisis.

HISTORIQUE

Les hydrocarbures sont très répandus dans les règnes végétal et animal. On rencontre essentiellement les paraffines $C_n H_{2n+2}$ à chaîne droite ou ramifiée. De nombreux travaux ont été consacrés à la mise en évidence de ces composés : Chibnall et Channon (1929), Kolattukudy (1965) mettent en évidence le nonacosane dans B. oleracea ; Mazliak observe les alcanes dans la cire de Carnauba (1961) et dans la cire des pommes (1963) ; Kaneda (1967) et Kolattukudy (1968c) dans Nicotiana tabacum. On les observe également dans les graines de D. africana, D. heckel (Cassagne, 1966) et de Crambe abyssinica (Mc Killican, 1966) ; on les rencontre dans les algues telles Scenedesmus quadricauda (Stransky, Streibl et Šorm, 1966), Anabaena variabilis (Fehler et Light, 1970), Botryococcus braunii (Gelpi, Oró et al., 1968) ; les bactéries en renferment (Tornabene, Oró, 1967 ; Albro et Dittmer, 1969a). Chez la levure il existe la série complète des alcanes normaux (Baraud et al. 1967) ; Gazzarini et al. (1966) les ont mis en évidence dans les parois des artères humaines (1966) et Nicolas (1955) dans le cerveau de boeuf.

Les alcanes sont donc des composés très répandus dans la matière vivante Leur composition moléculaire est très variable ; dans les cires des feuilles, les hydrocarbures impairs (nonacosane, heptacosane, hentriacontane) prédominent largement ; mais la constitution est loin d'être uniforme, selon les parties de la plante considérées. Il existe de grosses différences entre les hydrocarbures des cotylédons et ceux des feuilles de C. avellana. Dans les cotylédons, les hydrocarbures pairs sont en quantité à peu près équivalente à celle des hydrocarbure impairs (Cassagne 1967). Mazliak (1968b) a noté une prédominance assez constante des hydrocarbures impairs.

Eglinton et Hamilton (1963), Douglas et Eglinton (1965), ont proposé de considérer la composition en hydrocarbures des cires épicuticulaires comme un caractère taxonomique. En fait, la composition d'A. porrum, par exemple, est fortement tributaire du degré de maturité ; dans les levures, la composition et la nature des hydrocarbures sont fortement influencées par les conditions de culture.

BIOSYNTHESE DES HYDROCARBURES

Deux voies principales ont été proposées pour expliquer la biosynthèse des hydrocarbures : l'une fait appel à la condensation de deux acides, avec décarboxylation de l'un d'entre eux et conduit aux paraffines ; l'autre voie implique l'élongation d'un acide préexistant en acide à très longue chaîne (de 20 à 32 atomes de carbone), qui par décarboxylation conduit aux alcanes de longueur de chaîne n-1. Nous envisagerons successivement le mécanisme proposé par Clenshaw et al. (1929) et Channon (1929), celui résultant des travaux de Albro et Dittmer (1969 a, b, c, d) et nous analyserons enfin les 2 mécanismes développés par Kolattukudy.

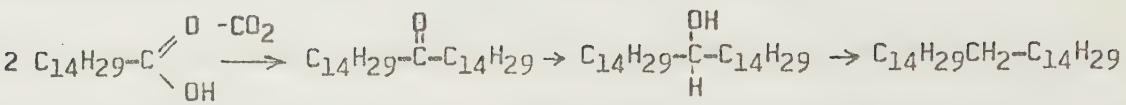
I - MECANISME DE CLENSHAW ET CHANNON ET CHIBNALL

Clenshaw et Smedley- Mc Lean (1929) proposent un mécanisme de synthèse des alcanes par condensation tête à tête de deux molécules d'acide palmitique pour la synthèse du n-hentriacontane dans les feuilles d'épinard. On aurait le schéma suivant :

$$2\ C_{14}H_{29}-CH_2-C(=O)-X \xrightarrow{-CO_2} C_{14}H_{29}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-C_{14}H_{29} \longrightarrow C_{15}H_{31}-CH_2-C_{15}H_{31}$$

Par le même mécanisme Channon et Chibnall (1929) expliquent la synthèse du n. nonacosane de B. oleracea par condensation de 2 molécules d'acide penta-

décanoïque :



Ce schéma expliquait en même temps la synthèse de la 15-nonacosanone et du 15-nonacosanol ; cependant ces auteurs ne purent mettre en évidence l'oléfine intermédiaire, et les cétones et alcools furent observés dans peu de cas. De plus l'acide pentadécanoïque n'existe qu'à l'état de traces chez les végétaux. Les travaux de Kolattukudy ont permis de rejeter ce mécanisme, au moins sous la forme présentée par ces auteurs : les faits qui s'opposent à cette hypothèse sont les suivants :

a) On peut envisager pour la synthèse de l'acide pentadécanoïque deux voies principales :

D'une part, synthèse à partir d'une unité propionate, par addition de 6 chaînons d'acétate. Si tel est le cas, le groupement carbonyle de la 15 nonacosanone devrait être marqué par l'acétate 1-^{14}C et pas par l'acétate 2-^{14}C. Or c'est l'inverse que l'on observe dans B. oleracea (Kolattukudy, 1965).

D'autre part, synthèse par α-oxydation de l'acide palmitique (Martin et Stumpf, 1959) ; dans ces conditions on doit s'attendre à une meilleure incorporation du C_{15} que du C_{16} : l'expérience montre que le C_{15} est 5 fois moins incorporé que le C_{16} dans le nonacosane (Kolattukudy, 1966).

b) L'acide palmitique 1-^{14}C est incorporé au même taux que l'acide U-^{14}C, or une réaction de condensation selon le schéma précédent entraîne la perte d'un groupement carboxyle et par conséquent l'incorporation 2 fois plus faible avec le C_{16} 1-^{14}C.

c) L'acide stéarique est incorporé en entier dans les alcanes de B. oleracea (Kolattukudy, 1966), et plus rapidement que l'acide palmitique. Des expériences réalisées avec l'acide stéarique ^{14}C, ^{3}H montrent qu'il est incorporé en entier dans les alcanes des feuilles de pois et d'épinard (Kolattukudy, 1968a). Cela met fortement en cause le schéma de synthèse de Clenshaw.

d) Les chaînes intactes d'acides palmitique et stéarique sont incorporées dans la n. nonacosanone : cela suppose que l'introduction de la fonction carbonyle est postérieure à l'allongement de la chaîne ; l'activité spécifique des alcanes est constamment supérieure à celle des cétones ; il n'y a pas forcément de lien métabolique entre ces composés (Kolattukudy 1965, 1966). Il semble donc que chez les végétaux un mécanisme par condensation directe selon le schéma précédent ne puisse avoir lieu.

II - MECANISME DE BIOSYNTHESE DE ALBRO ET DITTMER

L'étude de la biosynthèse des hydrocarbures de Sarcina lutea conduit Albro et Dittmer (1969a) à proposer un nouveau mécanisme de condensation fondé sur les observations suivantes :

- L'acide prépondérant est le C_{15} ramifié en position anteiso qui représente environ 90 % du total. L'hydrocarbure principal est une oléfine en C_{29} ramifiée aux 2 extrémités. La double liaison est située entre les atomes de carbone 13 et 14 de la chaîne principale. Or la condensation de 2 molécules d'acide anteiso C_{15} conduirait précisément à un hydrocarbure ramifié ayant la double liaison entre les carbones 13 et 14.

- Les cétones ne semblent pas être des intermédiaires directs. L'incorporation y est en effet environ 20 fois inférieure à celle des acides gras (Albro

et Dittmer, 1969c).

- Le fait que les hydrocarbures sont ramifiés rend peu vraisemblable chez Sarcina lutea la présence d'un mécanisme d'élongation des acides gras. Du reste les acides de C_{22} à C_{32} ne sont pas observés.

- L'acide palmitique ajouté à un milieu riche en acétate est incorporé sans décarboxylation ; par contre, sur un milieu pauvre en acétate, 60 à 70 % des groupements $^{14}COOH$ ne sont pas incorporés : on pourrait penser que l'acétate provoque un glissement d'un mécanisme d'élongation à un mécanisme de condensation. Il semble plutôt que la présence -ou non- d'acétate, provoque un glissement dans le mode d'entrée du palmitate exogène dans le système enzymatique de condensation tête à tête.

- Des travaux "in vitro" sur des préparations acellulaires (Albro et Dittmer, 1969d) montrent que l'ATP, le CoA et les ions Mg^{2+} sont requis pour la synthèse du dérivé R-CO∼SCoA, et le palmitoyl-CoA est 20 fois mieux incorporé que le palmitate libre.

Pour Albro et Dittmer (1969d) il y a deux modes d'entrée, l'un conduisant à une décarboxylation, (mode "donneur"), l'autre à une incorporation sans diminution de la chaîne (mode "accepteur"). Un plasmalogène neutre pourrait être l'intermédiaire par lequel la moitié "accepteur" intervient dans le système. (Albro et Dittmer, 1970). Les plasmalogènes exogènes contenant de l'acide palmitique marqué participent 3 fois plus à la synthèse que l'acide palmitique libre. Le schéma proposé est donc le suivant :

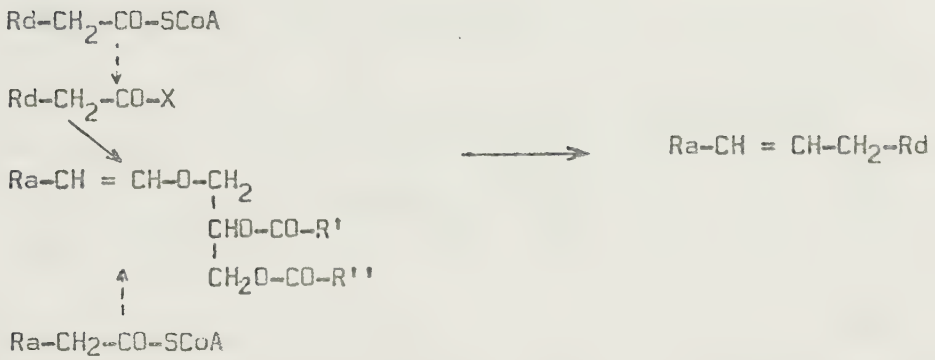


Schéma proposé par Albro et Dittmer (1970)

Ra = chaîne de l'accepteur

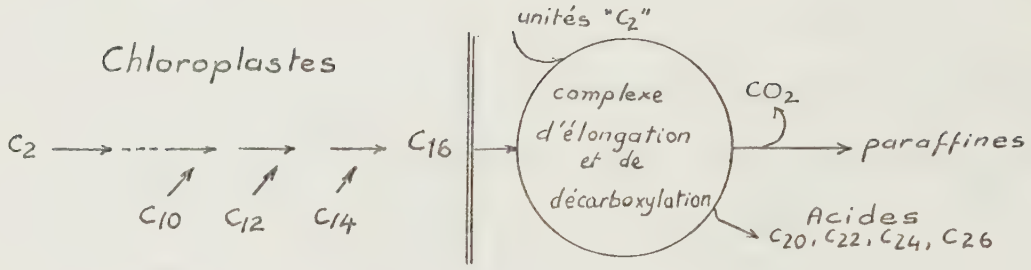
Rd = chaîne du donneur

Ce mécanisme rend compte des phénomènes observés dans S. lutea, et en particulier les hydrocarbures se forment sans passage par une cétone et un alcool intermédiaires. Ils sont en bon accord aussi avec ceux obtenus par Kaneda (1967, 1968).

III - MECANISMES PROPOSES PAR KOLATTUKUDY

a) Mécanisme d'élongation-décarboxylation :

Kolattukudy a proposé un mécanisme rendant compte de nombreux faits expérimentaux. Il fait appel (schéma) à l'existence d'un système d'élongation et de décarboxylation. L'acide palmitique, sous forme C_{16}-CoA ou C_{16}-ACP produit dans les chloroplastes est le substrat d'un complexe enzymatique, qui après avoir allongé le C_{16} jusqu'à C_{30} ou C_{32}, décarboxyle l'acide formé et libère la paraffine. Selon la spécificité du système le C_{29} ou le C_{31} sont les alcanes majeurs.



Mécanisme d'élongation et de décarboxylation, d'après Kolattukudy (1970)

Cette hypothèse s'appuie sur les faits déjà énoncés pour rejeter le mécanisme de Channon et Chibnall et sur les remarques suivantes :

- Le trichloroacétate à faible concentration inhibe fortement la synthèse des alcanes, sans affecter la synthèse des acides gras (Kolattukudy, 1965)

- La synthèse des acides gras, couplée aux réactions de la photosynthèse est stimulée par la lumière et inhibée par la chlorophényl diméthylurée (C.M.U.). D'un autre côté la synthèse des alcanes est indépendante de la lumière. L'incorporation d'acétate est moins sensible au C.M.U. dans les paraffines que dans les acides gras (Kolattukudy, 1966).

- Les précurseurs incorporés dans les alcanes le sont également dans les acides gras à très longue chaîne (Kolattukudy 1968a)

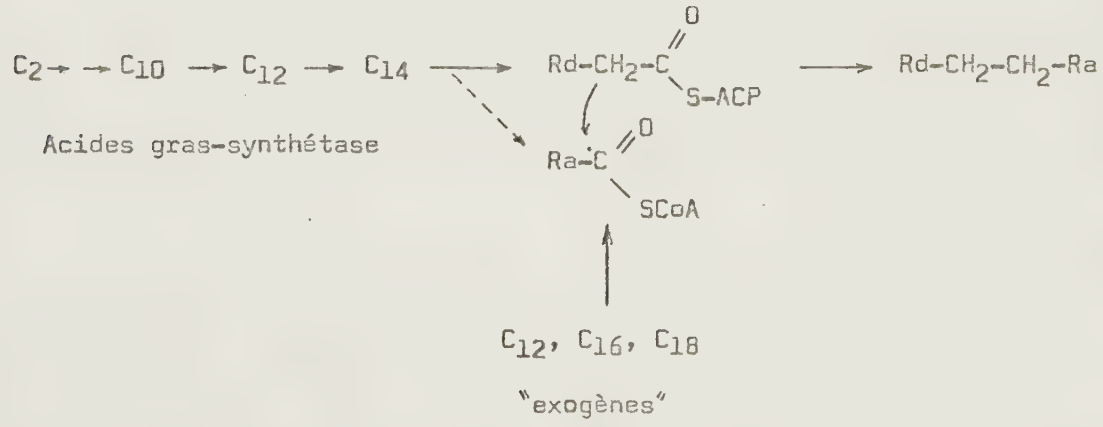
- L'épiderme isolé de Senecio odoris est capable de synthétiser des acides gras à très longue chaîne et des alcanes (Kolattukudy, 1968c).

Mais aucune preuve directe de l'existence d'un tel mécanisme n'existe à ce jour. Il n'existe aucune évidence du transfert des acides gras des chloroplastes vers les épidermes; bien plus, les épidermes isolés de Senecio odoris synthétisant les alcanes à des taux égaux à ceux de la feuille entière, il est

possible que les deux systèmes ne soient pas dépendants.

b) Mécanisme de condensation "accepteur-donneur" :

Une autre possibilité pour expliquer la biosynthèse des paraffines est la condensation entre 2 acides gras différents et par leur longueur et par leur rôle. Ainsi la condensation du C_{18} (dont on sait qu'il est introduit tel quel dans la chaîne des alcanes) avec un C_{12} pourrait conduire à la paraffine en C_{29}. Dans un tel mécanisme, il y aurait 2 acides au rôle dissymétrique : l'acide "accepteur" reçoit la chaîne alkyle de l'acide "donneur" qui perd son carboxyle dans le processus de condensation. (Kolattukudy 1968c). Mais le C_{12} est incorporé sans décarboxylation dans les hydrocarbures. Donc s'il y a condensation, les acides exogènes ne pourraient, chez les végétaux supérieurs, être incorporés dans les alcanes que par la voie de l'"accepteur". Kolattukudy (1970) suppose par exemple que les acides endogènes "donneurs" sont liés au système enzymatique Acyl Carrier Protein (acides "ACP-liés"), et que les acides exogènes "accepteurs" ne le sont pas. On pourrait avoir le schéma : (Kolattukudy, 1970)



Ainsi les acides gras à très longue chaîne n'auraient aucun lien métabolique avec les alcanes et leur seul point commun tiendrait à la proximité de leur site de synthèse dans l'épiderme.

PLAN DE L'ETUDE

Nous avons cherché si, dans des végétaux bien choisis, l'un des mécanismes proposés pouvait rendre compte des phénomènes.

Dans une première partie, nous avons étudié, au cours du mûrissement de graines de Corylus, les variations dans les taux en acides gras et hydrocarbures des fractions lipidiques "libre" et "liée" définies par leur différence de comportement vis-à-vis de solvants tels que l'oxyde d'éthyle et le méthanol. Nous avons comparé les variations dans les pourcentages des acides gras à celles relevées dans les hydrocarbures. Cet examen nous a conduit à étudier les feuilles de Corylus et nous en avons déduit un certain nombre de remarques concernant une éventuelle relation entre les acides gras et les alcanes.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié les hydrocarbures des cires d'Allium porrum et tenté de préciser la voie de synthèse de ces composés à l'aide de précurseurs possibles isotopiquement marqués ; après avoir recherché les sites de synthèse, nous avons envisagé l'influence de la lumière sur la biosynthèse des alcanes.

L'examen des activités spécifiques des alcanes et des acides gras à très longue chaîne, après administration de précurseurs tels que l'acétate, le propionate et l'isobutyrate de sodium marqués au ^{14}C, nous a amené à proposer un schéma de biosynthèse plausible, rendant compte de la plupart des faits expérimentaux.

Dans la troisième partie, nous nous sommes préoccupé de la localisation et de la répartition des hydrocarbures au sein de la cellule de levure, fractionnée en parois cellulaires, membranes protoplastiques et contenu cellulaire. Les résultats obtenus ont été confirmés par l'étude de l'incorporation de l'acétate U-^{14}C dans les différentes parties de la cellule.

PREMIÈRE PARTIE

chapitre I

ETUDE DE LA LIPOGENESE DE DIVERSES VARIETES DE NOISETIERS

I - DEFINITION DES FRUITS PRELEVES :

Cette étude porte sur la nature et l'évolution des lipides de diverses variétés de noisetiers. Les descriptions morphologiques, physiologiques et botaniques que nous donnons sont extraites d'un travail de P. Léglise (1969), qui a déterminé toutes les variétés sur lesquelles nous avons travaillé.

On sait qu'il existe cinq espèces principales de Corylus : C. avellana, C. maxima, C. pontica, C. colurna, et C. cornuta. Nous avons étudié des variétés issues de 3 d'entre elles :

Corylus avellana

Arbuste vigoureux atteignant trois à cinq mètres de hauteur, que l'on rencontre à l'état spontané en Europe, en Asie et en Afrique septentrionale. Port érigé, charpente vigoureuse, fruits souvent globuleux avec un amandon emplissant la coque et un involucre allongé, dentelé au sommet, parfois plus court que le fruit.

Corylus maxima

Arbuste au port étalé et aux feuilles larges, atteignant trois à cinq mètres de hauteur, que l'on rencontre à l'état spontané en Orient, en Europe méridionale et en Russie. Fruits groupés par trois dans un involucre tubulaire ; coque mince très friable, protégeant un amandon de très bonne qualité, allongé .

avec une pellicule de couleur blanche, rose ou pourpre.

Corylus pontica

Egalement appelé noisetier du Pont ou noisetier de Hérakléon ; arbust de quatre à six mètres, aux feuilles larges, arrondies ; fruits groupés par deux ou trois, parfois plus dans un involucre plus long que le fruit ; les variétés de cette espèce se cultivent sur le littoral de la Mer Noire.

L'étude de la collection de la Station de recherche de la Grande Ferrade a fait apparaître de nombreuses synonymies et de fréquentes erreurs de dénominations variétales.

Sept variétés parfaitement déterminées ont été choisies dans la collection de la Grande Ferrade pour l'étude des lipides :

Corylus avellana

Négret, clône 133-1

Longue d'Espagne N 27-3

Coutard 102-2

Merveille de Bollwiller 122-3

Corylus maxima

Feuillage vert N 12-3

Feuillage pourpre N 124

Corylus pontica Corylus avellana

Impériale de Trébizonde 103-2

Description des noisetiers étudiés :

Négret : feuillaison et floraison précoces dans le Sud-ouest de la France ; maturité précoce (fin août) ; les fruits se libèrent de leur involucre et chutent librement ; l'involucre est moyennement lacinié ; le fruit est moyen et rond, très régulier ; la coque est foncée, peu vernissée ; l'amandon blanc, de très bonne qualité est recherché dans l'industrie alimentaire.

Longue d'Espagne : feuillaison tardive, floraison de précocité moyenne à tardive ; maturité à la fin d'août ; les fruits se libèrent de leur involucre et chutent. L'involucre est peu lacinié, très adhérent à la noisette au début de la maturité. Le fruit est gros et allongé, légèrement aplati sur deux faces, strié, brun foncé, non vernissé. Le talon est très développé. L'amandon est blanc, très parfumé et emplit bien la coque.

Fertile de Coutard : feuillaison précoce (fin février, début mars), floraison très précoce ; à noter l'absence de dichogamie pour l'ensemble des souches observées; maturité à la fin août ; les fruits se séparent de l'involucre et chutent librement ; l'involucre est très lacinié, dépasse à peine le fruit ; le fruit est très gros ; la coque est foncée, arrondie, bosselée au sommet, cordiforme, cannelée, dure. L'amandon ivoire clair est sucré et remplit bien la coque.

Merveille de Bollwiller : feuillaison et floraison très tardives ; la dichogamie est relativement courte (une semaine maximum ; maturité mi à fin septembre à Bordeaux ; les fruits se séparent de l'involucre et chutent librement ; l'involucre est peu lacinié, légèrement plus court que le fruit ; les fruits sont très gros, ronds, pointus au sommet ; le talon est très développé. La coque de couleur brun clair vernissé est dure ; l'amandon blanc de bonne qualité, sucré

et parfumé emplit bien la coque. La pellicule est de couleur havane clair.

Corylus maxima feuillage pourpre : d'une façon générale ces variétés ne sont pas dichogames. Lorsqu'il y a dichogamie, elles peuvent parfois être protogyniques. Les chatons sont volumineux et longs, de couleur verte ou brune. La maturité est précoce, les involucres chutent avec les fruits ; l'involucre est long, étroit, comprimant bien le fruit, lacinié à moyennement lacinié au sommet.

Le fruit est moyen à petit, parfois cyclindrique, le plus souvent conique La coque est tendre, brune plus ou moins foncée, bien pleine. L'amandon de très bonne qualité est sucré et parfumé.

Impériale de Tréhizonde : variété issue de l'espèce C. pontica, vraisemblablement hybride avec C. avellana. La feuillaison et la floraison sont précoces; la dichogamie est courte (une semaine à dix jours), maturité à la fin d'août ; les fruits se détachent alors de l'involucre et chutent ; l'involucre est duveteux, nervuré, long de quatre à cinq centimètres ; très resserré autour du fruit, il s'élargit à l'extrémité en forme de couronne laciniée. Le pédoncule est duveteux, côtelé et possède un sillon médian.

Le fruit est gros et rond, légèrement aplati au sommet ; le talon est très développé et plat ; la coque est tendre, vernissée ; l'amandon est blanc et de bonne qualité.

II - ETUDE DE LA LIPOGENESE

a) Généralités :

De nombreux auteurs se sont intéressés au phénomène de l'accumula-

tion des lipides dans les graines oléagineuses, Eyre (1931), Wolfe et al. (1942), Grindley (1950), Ulrich (1952), Butt et Beevers (1966), Mazliak (1968a). Le schéma en est presque toujours le même : au début de la formation de la graine, il n'y a pratiquement aucune synthèse lipidique ; cette période est suivie d'une intense lipogenèse qui en un mois donne à la graine sa teneur maximum en lipides ; parallèlement, le quotient respiratoire de la graine de ricin, par exemple, passe de 0,7 à 1,1 pendant la période de synthèse lipidique (Burr et Miller, 1938). On sait que chez les végétaux, à la différence des animaux, il n'y a pas transfert des lipides d'un point à l'autre de la plante, ce qui a conduit à l'hypothèse d'une transformation in situ des glucides en lipides. Une confirmation expérimentale a été fournie par Quackenbusch et Simmons (1954), fournissant du saccharose U ^{14}C à des plants de soja ; les résultats montrent une forte incorporation de l'activité du saccharose dans les lipides et en particulier les acides gras de la graine. Selon Mazliak (1968a) le placenta joue un rôle important dans la fourniture d'acétyl-CoA au début de la formation des graines.

Mais pour cet auteur, aucune synthèse lipidique ne s'observe dans le placenta même.

Nous avons étudié en fonction du temps l'évolution du poids moyen des fruits précédemment définis, ainsi que les teneurs en lipides totaux. On sait que le poids moyen d'un fruit au cours de son développement croît progressivement jusqu'à un maximum selon une courbe d'allure sigmoïde. La région moyenne de la courbe est à peu près une droite qui correspond à la vitesse moyenne de croissance (Ulrich, 1952).

De nombreux mémoires ont décrit la culture du noisetier et l'utilisation

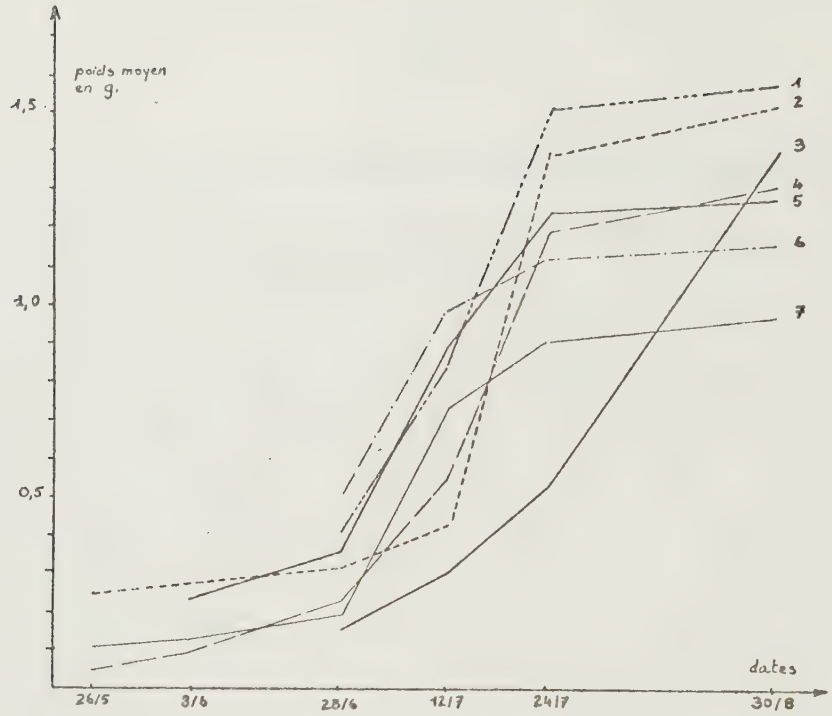


Fig. 1. Evolution du poids moyen des noisettes en fonction du temps
1. Fertile de Coutard. 2. Impériale de Trébizonde.
3. Merveille de Bollwiller. 4. Longue d'Espagne. 5. Négret.
6. *C. maxima* vert. 7. *C. maxima* pourpre.

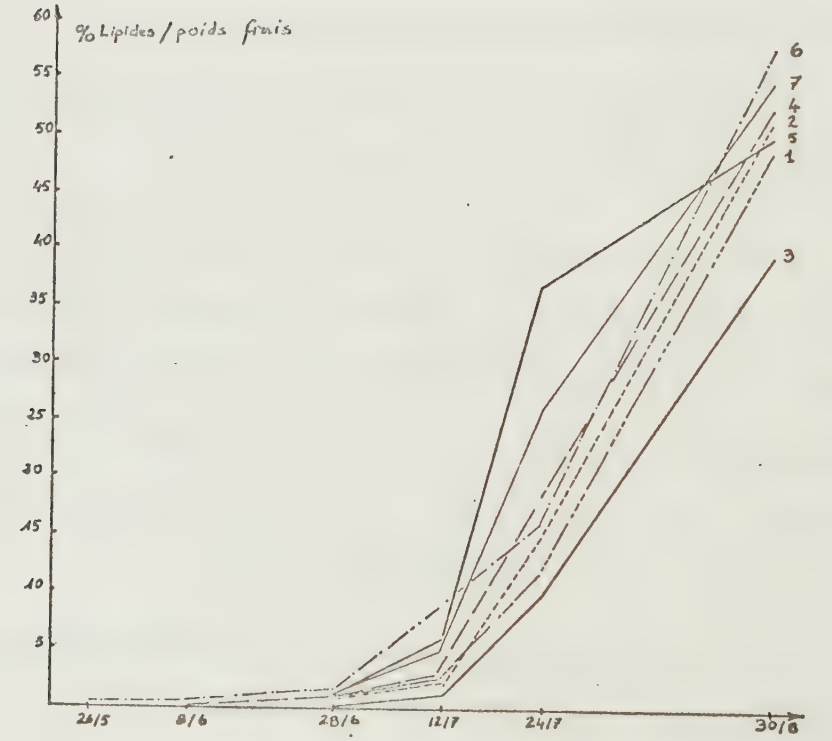


Fig. 2. Evolution des teneurs en lipides en fonction du temps (même désignation des variétés que pour la fig. 1).

de l'huile extraite des noisettes, en particulier ceux de Schuster (1936), Evreinoff (1958, 1961), mais portent généralement sur des variétés peu ou mal définies. A notre connaissance aucun auteur n'a décrit la lipogenèse chez le noisetier ; il nous a donc paru important de mener à bien cette étude préalablement à l'analyse des lipides eux-mêmes.

b) Evolution du poids moyen des fruits en fonction du temps :

A partir de la nouaison, il a été procédé à des prélèvements réguliers et homogènes, en utilisant un seul clône par variété ; les fruits prélevés étaient au même stade de développement, pour une date donnée. Les fruits ont été débarrassés de leurs involucres avant toute pesée. La courbe obtenue en portant sur un graphique les poids moyens des fruits frais en fonction du temps est donnée dans la figure 1. D'une façon générale on observe bien la forme en "S" décrite par Ulrich (1952) pour d'autres fruits.

On peut remarquer que si l'on excepte "Merveille de Bollwiller", variété particulièrement tardive, la croissance du fruit est extrêmement rapide, et le poids définitif est atteint en quinze jours à un mois selon les espèces.

c) Extraction des lipides :

Les cotylédons sont portés à l'étuve à 100° pendant 10 minutes puis broyés ; les constituants lipidiques en sont extraits en soxhlet au reflux de l'éther dépéroxydé pendant 48 h : on obtient ainsi la fraction dite "libre" des lipides.

On fait alors une deuxième extraction au reflux du méthanol pendant 24 h : on obtient la fraction dite "liée" des lipides. Cette séparation quoique

grossière a été utilisée en raison des différences notées dans les taux en acides gras et hydrocarbures des deux fractions. L'extraction au méthanol peut provoquer l'apparition d'artefacts mais nous avons uniquement étudié les acides gras, après saponification, et ces artefacts tel le phosphatidylméthanol noté par Douce et al. (1966) ne sont pas gênants.

d) Evolution des teneurs en lipides en fonction du temps :

Lors des trois premiers prélèvements on n'observe pas la formation des cotylédons : les lipides extraits sont donc uniquement dus au placenta.

Les résultats obtenus sont portés sur la figure 2. On voit que pour les trois premiers prélèvements, correspondant aux lipides de l'albumen, les taux sont toujours très faibles, de l'ordre de 1 % en poids de fruit frais. A partir du quatrième prélèvement, avec l'apparition des cotylédons de l'amandon, on assiste à une lipogenèse intense qui en moins d'un mois va donner au fruit son taux de lipides définitif ; en même temps, l'albumen disparaît progressivement.

e) Conclusions :

Si l'on compare les résultats portés dans les figures 1 et 2, on constate une grande similitude des courbes obtenues ; cependant il existe un décalage d'environ quinze jours entre les courbes de poids moyen et celles des taux de lipides ; on note ainsi qu'à la fin de juillet les noisettes ont atteint leur poids définitif, à l'exception de "Merveille de Bollwiller", variété tardive, alors qu'elles renferment tout au plus la moitié de leurs lipides ; à partir de cette date, le poids total restant constant, la synthèse intense des lipides est compensée par la disparition de l'albumen. Ce résultat reflète la transformation

in situ des glucides du placenta en lipides. Les faibles taux de lipides observés dans l'albumen et, comme nous le verrons plus loin, leur composition particulière en acides gras, laissent penser qu'il s'agit ici de lipides constitutifs et non de réserve, comme c'est le cas pour les cotylédons, à partir du quatrième prélèvement.

chapitre II

ETUDE DES ACIDES GRAS

I - GENERALITES

Les théories actuelles sur la biosynthèse des hydrocarbures envisagent la décarboxylation d'un acide gras à longue chaîne formé soit par élongation, soit par condensation de deux acides gras à chaîne de longueur moyenne, à 15 atomes de carbone par exemple.

Avant d'étudier les hydrocarbures, il est donc nécessaire de connaître la composition en acides gras des graines de Corylus.

Cette étude a été effectuée pour répondre essentiellement à deux questions :

1°) Quels sont les changements observés dans la composition en acides gras de la graine au cours du mûrissement ?

2°) Peut-on établir une relation de précurseur à produit entre les acides gras et les hydrocarbures ?

De très nombreux travaux ont été consacrés à l'évolution des compositions en acides gras de différents lipides. En 1950, Grindley suit, sur la graine de coton, l'apparition des acides gras : les acides oléique et linoléique augmentent en poids pendant le vieillissement.

Hopkins et Chisholm (1961) ont montré que dans la graine de tournesol on assiste à une insaturation croissante des lipides due à une biosynthèse de plus en plus active des dérivés polyinsaturés. Selon Crombie (1956) étudiant le palmier à huile, on n'observe tout d'abord que des traces d'acides habituels insaturés en C_{18} ; 15 semaines après la pollinisation, l'acide laurique passe de 5 à 50 % des acides totaux, alors que l'acide myristique croît également. Sims, Mc Gregor et al. (1961) observent dans la graine de carthame en développement une rapide augmentation du taux d'acide linoléique, alors que la formation d'acide oléique reste constante.

Les acides gras de la noisette ont fait l'objet de peu d'études sur des variétés plus ou moins bien déterminées (Schuette et Chang 1933, Fang et Bullis 1949) ; la composition en acides gras montre une nette prédominance de l'acide oléique, qui représente de 60 à 80 % du total. Avant d'entreprendre cette étude, nous avons envisagé la composition en glycérides de la fraction lipidique libre. On observe en fonction du temps, un accroissement des taux en triglycérides qui représentent à maturité de 90 à 95 % du total selon les variétés, (Cassagne, résultats non publiés).

II - ETUDE DES ACIDES GRAS A MATURITE

a) Mode opératoire et résultats :

Les lipides extraits des noisettes à maturité sont saponifiés ; l'insaponifiable est lavé et séché pour étude ultérieure, les savons sont acidifiés et méthylés selon la technique de Metcalfe et Schmitz (1961).

Une étude approfondie des produits de la réaction d'estérification en présence de BF_3, nous a montré qu'il y a apparition d'artefacts, tels que l'acide

Tableau I

CONSTITUTION en ACIDES GRAS des DIVERSES VARIETES de NOISETTES à MATURITE

(en % des acides gras totaux)

Acides	Fertile de Coutard	Longue d'Espagne	Impériale de Trébizonde	Merveille de Bollwiller	Négret	C. Maxima I54-I
C_{I2}	t	t	t	t	t	t
C_{I4}	0,2	0,3	t	0,2	0,4	t
C_{I5}	t	t	t	t	t	t
C_{I6}	3,6	3,8	4,3	3,2	6,2	7,4
$C_{I6:I}$	t	t	t	t	t	t
C_{I7}	t	t	-	t	-	-
$C_{I8\ iso}$	-	t	t	-	t	t
C_{I8}	0,7	0,8	0,5	0,5	0,6	0,5
$C_{I8:I}$	84,3	84,I	83,8	86,0	92,7	80,5
$C_{I8:2}$	I0,8	II,8	II,6	9,8	t	II,9
$C_{I8:3}$	0,4	t	0,2	t	t	t
C_{20}	t	t	t	-	t	t
$C_{20:I}$	t	-	-	0,2	-	-
$C_{20:2}$	t	-	t	-	-	t

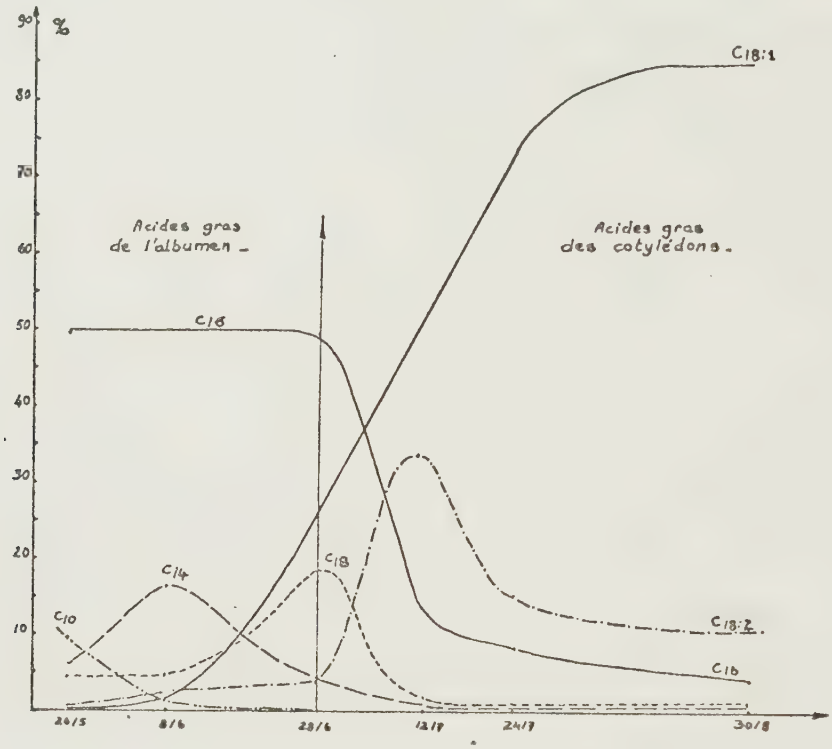
méthoxy 10-octadécanoïque dès que le taux de BF_3 dépasse 40 % (Cassagne, résultats non publiés) ; toutes les estérifications ont été réalisées avec une solution de BF_3 à 14 % dans le méthanol. Les esters sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les acides sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention à ceux d'acides connus, à différentes températures ; les taux ont été calculés par triangulation en supposant constant et égal à 1 le coefficient de réponse du détecteur pour tous les acides. Les valeurs obtenues sont portées dans le tableau I. On constate que les lipides "libres" des graines de Corylus ont une composition extrêmement simple à maturité, l'acide en C_{18} monoéthylénique représente de 80 à 90 % du total. Il est donc indispensable de préciser la structure de cet acide surtout en ce qui concerne la place de la double liaison. La fraction contenant les acides $C_{18:1}$ et $C_{18:2}$ a été piégée et étudiée par spectrométrie de masse ; le spectre obtenu est la superposition des spectres de l'oléate et du linoléate de méthyle ; mais d'après les travaux de Ryhage et Stenhagen (1959), les spectres de masse d'isomères de position de l'acide oléique ayant la double liaison en position 6, 7 ou plus ne sont pratiquement pas différenciés de celui de l'oléate de méthyle ; il est donc nécessaire de déterminer par voie chimique la place de la double liaison.

b) Oxydation permangano-periodique :

Nous avons utilisé une variante de la méthode décrite par Ucciani, Naudet et Pasero (1962) ; 300 mg d'esters méthyliques sont saponifiés et les acides extraits ; à 160 mg d'acides gras, on ajoute 37,5 ml de potasse 0,1 N et 200 ml d'eau ; on homogénéise, puis on verse par double liaison contenue dans la chaîne 100 ml d'une solution de $Na_3H_2IO_6$ à 13,75 g/l neutralisée par HCl 5 N et 10 ml de $KMnO_4$ M/100 ; on étend à 500 ml et on laisse une nuit à la température ambiante ;

Fig. 3 - Formation des principaux acides gras libres de C. avellana Longue d'Espagne en fonction du temps.

(en % des acides gras totaux)



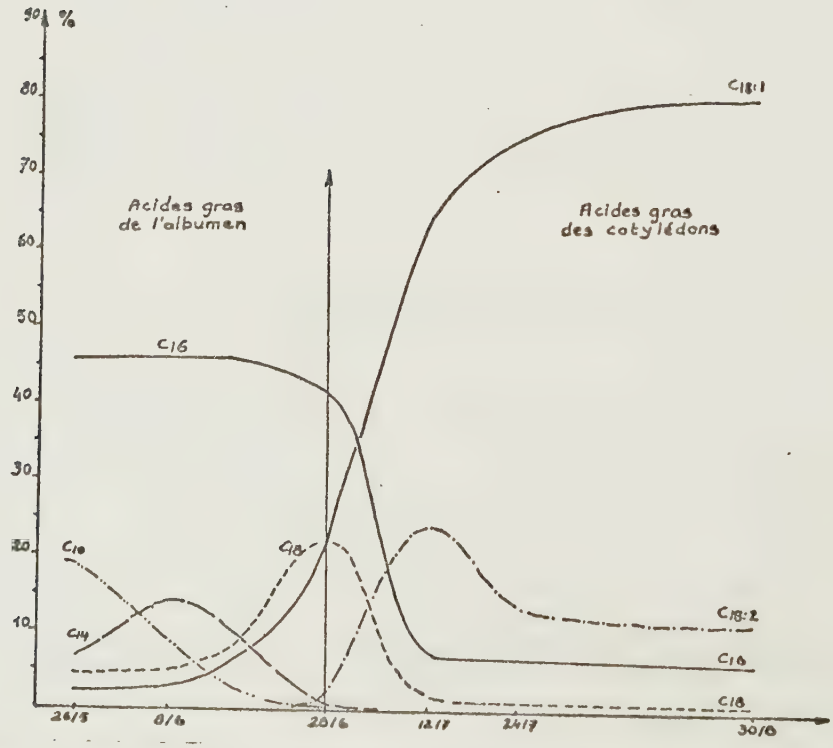


Fig. 4 - Formation des principaux acides gras libres de C. maxima en fonction du temps.

(en % des acides gras totaux).

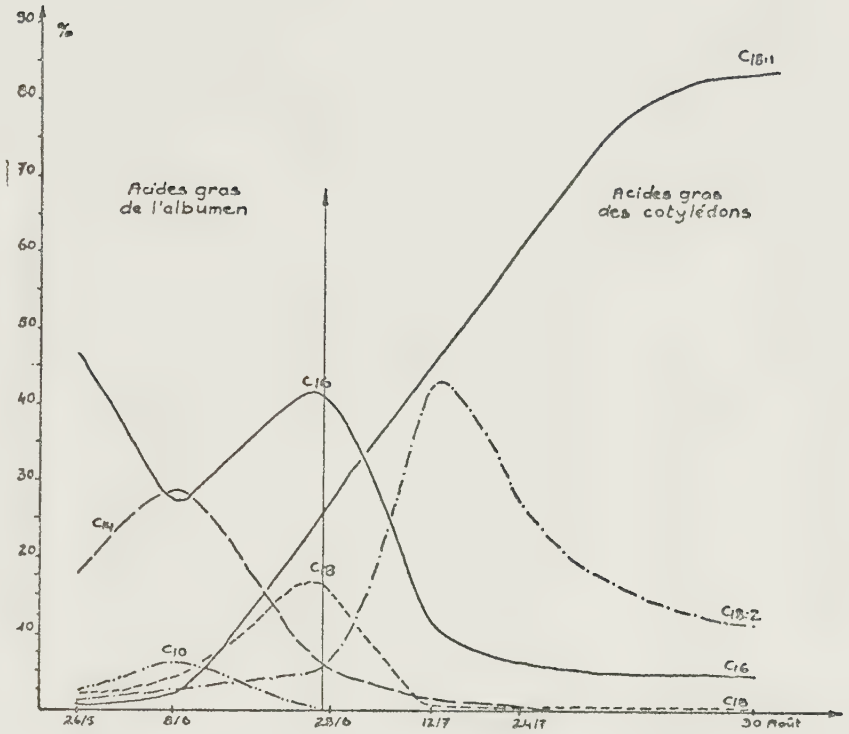


Fig. 5 - Formation des principaux acides gras libres de l'hybride Impériale de Trébizonde en fonction du temps (en % des acides gras totaux)

Tableau II

COMPOSITION en ACIDES GRAS des LIPIDES LIES

(en % des acides gras totaux)

Acides	Corylus maxima				Longue d'Espagne				Hybride Impériale de Trébizonde			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
C 8	t	t	t	-	0,3	t	-	-	t	-	t	-
C 9	-	-	-	-	-	t	-	-	t	-	0,1	-
C10	0,8	t	t	t	0,3	0,2	0,1	t	t	1,7	0,2	t
C11	-	-	-	-	-	-	t	-	-	1,0	0,1	-
C12	2,0	0,8	t	3,3	0,6	0,4	0,1	0,1	9,9	5,5	0,2	0,2
C12:1	-	t	-	0,3	-	-	-	-	t	2,8	0,2	-
C13	-	-	-	-	-	-	-	-	t	1,2	0,1	-
C14	16,6	14,0	1,5	0,7	12,6	8,4	5,7	3,0	27,4	20,0	6,6	2,6
C14:1	-	t	t	-	-	0,3	t	-	t	0,5	t	-
C15	1,9	0,6	0,1	t	1,1	0,7	0,2	t	2,8	3,2	0,5	0,2
i C16	1,8	t	0,1	-	1,0	t	-	-	2,4	t	t	-
C16	38,1	20,2	13,3	11,0	53,8	32,4	14,8	7,8	27,7	17,0	15,5	10,0
C16:1	t	0,4	0,8	0,2	t	0,3	0,7	0,4	3,6	1,3	0,5	0,8
C17	3,8	0,1	0,2	2,3	2,2	1,7	0,1	t	1,3	1,4	0,2	t
i C18	-	0,5	0,2	-	t	0,1	0,1	t	t	-	0,3	-
C18	5,9	1,3	2,5	1,5	4,7	2,6	1,8	0,4	4,6	1,6	1,0	1,6
C18:1	2,0	6,6	41,3	66,0	3,1	7,9	34,2	54,9	5,1	6,7	32,2	57,9
C18:2	2,5	35,2	36,9	10,2	8,6	28,7	37,5	32,4	1,5	23,5	39,2	25,4
C18:3	t	12,7	2,9	5,1	t	14,0	3,7	1,0	t	11,4	3,1	1,3
C20	1,8	t	0,2	t	4,9	2,3	1,0	t	1,5	1,2	t	t
C21	5,2	1,1	-	-	1,2	-	-	-	3,9	-	-	-
C21,6	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22	3,7	3,5	-	-	2,8	-	-	-	2,0	-	-	-
C22,6	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	3,8	2,5	-	-	2,0	-	-	-	2,3	-	-	-
C24	4,2	-	-	-	0,8	-	-	-	4,0	-	-	-

a : 26 mai 1967
b : 28 juin 1967
c : 12 juillet 1967
d : 30 août 1967

le pH est de 7,9 ; on acidifie jusqu'à pH 1 et on détruit l'excès d'oxydant par $NaHSO_3$ en présence d'empois d'amidon. On extrait par 100 ml d'éther éthylique sans concentration préalable de la phase aqueuse ; les acides sont lavés jusqu'à neutralité des eaux de lavage, séchés soigneusement sur Na_2SO_4, méthylés et analysés par CPG. On a fait des analyses à 3 températures : 146°, 180° et 186°. On observe l'apparition d'un pic important d'acide nonanoïque et une forte quantité d'acide nonanedioïque ; l'acide $C_{18:1}$ est donc l'acide oléique et non l'acide vaccénique ou tout autre isomère.

III - CINETIQUE DE FORMATION DES ACIDES GRAS

a) Résultats :

L'étude a été effectuée sur les fractions "libre" et "liée" des lipides de C. avellana longue d'Espagne N-27, C. maxima 154-1 et l'hybride Impériale de Trébizonde 103-2 (Cassagne et Baraud, 1968). Les acides gras obtenus lors de chaque prélèvement sont méthylés et analysés par CPG. Les valeurs obtenues sont portées sur les figures 3, 4, 5 et le tableau II. Les prélèvements du 26 mai au 28 juin montrent la répartition des acides gras dans l'albumen ; à partir du 12 juillet, on a mesuré les taux des acides gras dans les cotylédons.

b) Examen des résultats :

Dans les lipides "libres" de l'albumen, on observe la présence d'acides saturés de condensation croissante en fonction du temps. Le taux d'acide décanoïque est maximum le 26 mai ; dès le 8 juin, il a décru de 80 % ; le taux d'acide myristique est alors maximum. Le 28 juin, l'acide stéarique atteint sa plus haute valeur et le taux d'acide myristique est très faible ; l'acide oléique représente alors 25 % du total ; pendant toute cette période l'acide palmitique

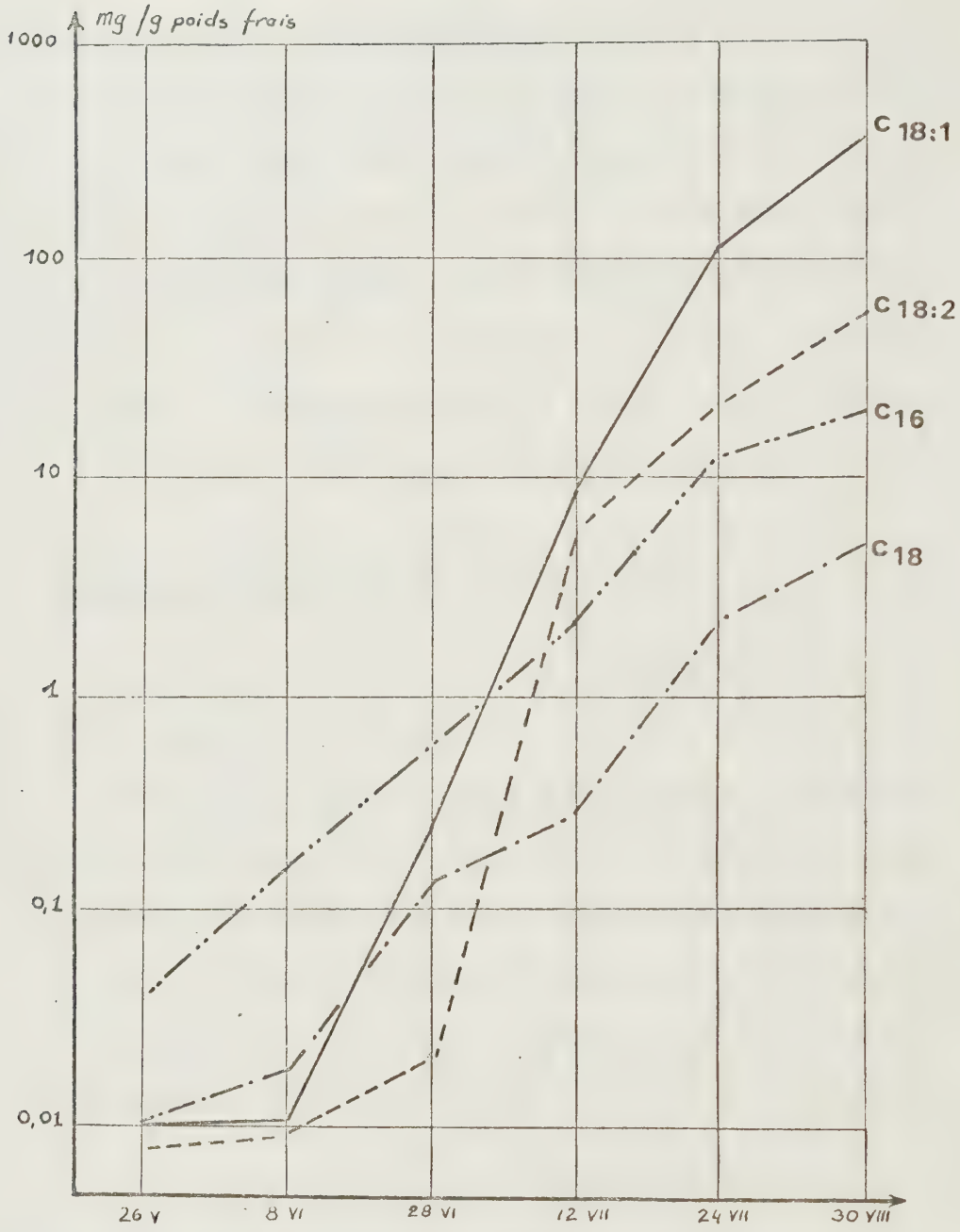


Fig. 6 - Formation des principaux acides gras libres de C. avellana Longue d'Espagne N 27/3 en fonction du temps. (en mg/g poids frais).

représente à lui seul 50 % du total.

Dès l'apparition des cotylédons, il y a une forte augmentation du taux de lipides. Les acides palmitique et stéarique disparaissent devant une syntèse intense des acides oléique et linoléique. Le 24 juillet, soit moins d'un mois après l'apparition des cotylédons, la composition en acides gras est presque définitive ; il est évident que les figures 3, 4 et 5 ne traduisent que les taux relatifs d'acides gras à un instant donné, et sont donc fonction des vitesses de formation : la quantité d'acide linoléique, par exemple, présente dans les cotylédons, ne décroît pas à partir du 12 juillet mais croît simplement moins vite que celle de l'acide oléique. Pour traduire clairement ce fait, nous avons porté sur la figure 6 l'évolution au cours du temps des masses d'acides de C. avellana Longue d'Espagne par g de poids frais. Ces masses ont été estimées en considérant le poids en lipides libres par g de poids frais comme le poids approximatif des glycérides, dont on a déduit systématiqueemnt le poids du glycérol. On est ensuite passé aux masses des différents acides gras en faisant intervenir leurs pourcentages respectifs dans les mélanges d'acides totaux.

On voit que les masses d'acides palmitique, stéarique et linoléique ne décroissent pas au cours du temps, mais augmentent beaucoup moins vite que celle de l'acide oléique qui est à maturité.le constituant essentiel des acides gras.

Les courbes sont semblables dans les 3 cas étudiés.

Pour les acides gras des lipides "liés", on observe un schéma similaire, avec cependant quelques différences ; les acides saturés montrent des taux décroissant régulièrement au cours du temps ; dans les cotylédons, les phénomènes observés vont dans le même sens que dans les lipides libres, mais les taux d'acide oléique

sont toujours plus faibles, alors que ceux de l'acide linoléique sont plus élevés ; dans les acides gras du 26 mai, on note la présence d'acides à longue chaîne, ayant jusqu'à 24 atomes de carbone que l'on n'observe plus après le 28 juin.

c) Discussion et conclusions :

L'analyse des lipides de l'albumen de noisettes montre des proportions relatives importantes d'acides gras légers au début de l'oléogenèse : le taux relatif d'acide caprique est d'abord important, puis il décroît au profit de l'acide myristique et ce dernier va à son tour s'effacer devant l'accumulation des acides plus lourds, en particulier du stéarique.

Ce que nous savons de la biosynthèse des acides gras ne fait pas penser que les acides soient élaborés en plusieurs fois bien qu'une chaîne de longueur faible, ayant par exemple de 6 à 10 atomes de carbone puisse être reprise pour être allongé ; l'allongement des chaînes carbonées se fait bien par stades successifs mais la chaîne aliphatique ne quitte le complexe multienzyme formateur que lorsqu'elle a atteint un certain stade. Cette séparation serait due à la rupture d'un équilibre entre un milieu plus ou moins hydrophile et la chaîne carbonée dont l'hydrophobie augmente avec sa longueur.

On peut donc penser que l'accumulation momentanée d'un acide, comme par exemple l'acide myristique, ne représente pas une étape dans la biosynthèse mais un produit final ; on peut imaginer par exemple que les conditions d'environnement cellulaire évoluent avec l'âge de l'albumen de sorte que les acides gras se séparent de moins en moins précocement du complexe multienzyme. Cela expliquerait que l'on puisse isoler des acides gras, qui sont normalement des intermédiaires, aux stades jeunes.

Pendant toute la période précédant l'apparition des cotylédons, il y a peu de synthèse de dérivés éthyléniques : seul l'acide oléique se trouve à un taux d'environ 25 % à partir du 28 juin.

Le fait prépondérant dans les cotylédons est l'accumulation des acides insaturés. Si l'acide stéarique se forme par élongation de la chaîne préexistante, la synthèse de l'acide oléique se produit en même temps et à une vitesse supérieure dès la formation des cotylédons la vitesse de formation du C_{18} saturé décroît, celle de l'acide oléique continuant à augmenter.

Il faut également revenir sur un fait extrêmement intéressant observé dans les lipides "liés" de l'albumen : la présence à des taux de l'ordre de 4 % d'acides à longue chaîne de C_{20} à C_{24}, que l'on n'observe plus dans les cotylédons la question est alors la suivante : la synthèse d'acides observée dans l'albumen est-elle due au même système enzymatique que dans les cotylédons ? Les taux très faibles en lipides du placenta font penser qu'il s'agit là plutôt de lipides constitutifs de ce tissu ; il est possible qu'il existe un pool d'acides gras différent, à l'activité constante et très faible et que l'on n'observe qu'au moment de la plus faible activité du système enzymatique caractéristique des lipides de réserve de la graine, donc de la fin de mai à la fin de juin ; cela peut expliquer les fortes différences constatées dans les compositions en acides gras au cours du temps.

chapitre III

ETUDE DES HYDROCARBURES

I - INTRODUCTION

Nous avons étudié au cours du mûrissement les variations dans la composition de la fraction hydrocarbures des lipides des graines de Corylus avellana, C. maxima et de l'hybride Impériale de Trébizonde. Peu d'études ont été consacrées à ce sujet : M. Mc Killican (1966) a suivi l'évolution des taux en hydrocarbures dans les graines de Crambe abyssinica ; Stransky, Streibl et Herout (1967) ont étudié à trois stades de développement successifs la composition en hydrocarbures de différentes plantes. Comme pour les acides gras, nous avons étudié séparément les hydrocarbures des fractions "libre" et "liée" ; les hydrocarbures sont séparés du reste de l'insaponifiable par chromatographie sur colonne d'alumine ; cette méthode, utilisée par de nombreux auteurs, en particulier Mazliak (1963), Walbecq (1966), Cassagne (1966), donne de bons résultats ; le spectre infra-rouge, établi sur la fraction des hydrocarbures recueillie après chromatographie, montre qu'il s'agit bien d'une fraction homogène et les bandes observées ne sont attribuables qu'à des hydrocarbures ; cette fraction est alors étudiée par chromatographie en phase gazeuse pour déterminer les taux des différents hydrocarbures au sein du mélange.

II - TECHNIQUE D'ETUDE

a) Chromatographie sur colonne d'alumine :

Les insaponifiables des lipides déjà analysés quant à leur composition en acides gras, sont chromatographiés par l'hexane sur une colonne d'alumine ; des tests portant sur la qualité de l'alumine nous ont montré qu'elle contient des traces d'impuretés organiques gênantes ; une purification suffisante est obtenue en extrayant en soxhlet ces impuretés par le méthanol ; l'éluant est l'hexane pour spectroscopie dans l'ultra-violet qui ne présente pas d'impuretés décelables par chromatographie en phase gazeuse. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une colonne d'alumine de 4 mm de diamètre et 35 cm de hauteur, chargée de 5,8 à 6 g d'alumine purifiée de force 1. La charge maximum de la colonne est de 20 mg d'insaponifiable par gramme d'alumine. La colonne est remplie à sec et légèrement tassée ; l'ensemble des hydrocarbures est recueilli dans 50 ml d'éluat ; l'hexane est éliminé et le résidu pesé. Par la spectrométrie infra-rouge, on n'observe que des bandes attribuables à des hydrocarbures.

b) Chromatographie en phase gazeuse :

Les analyses ont été réalisées dans les conditions suivantes :

1°) F & M 810 à ionisation de flamme

Colonne d'apiezon L 10 % sur chromosorb G (AW 60/80) 2 m, 1/4 pouce

Température du four : 240° pour les carbures légers

285° pour les carbures lourds.

Colonne de D.E.S.S. à 10 % sur chromosorb G (AW 60/80) 2 m, 1/4 pouce.

Température du four : 150° pour les carbures légers

200° pour les carbures lourds

2°) F & M 5750 à ionisation de flamme

Colonne UCC 982 à 10 % sur chromosorb W (60/80), 2 m, 1/8 pouce

Température du four : 250° et 270°

Les alcanes ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention à ceux de mélanges connus d'alcanes à différentes températures. Les pourcentages ont été calculés par triangulation, en supposant constant et égal à 1 le coefficien de réponse du détecteur pour les différents hydrocarbures.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

a) Taux d'hydrocarbures :

Les taux d'hydrocarbures des cotylédons de noisettes à maturité, sont portés dans le tableau III.

Tableau III

Taux en mg/100 g

	Longue d'Espagne	Impériale de Trébizonde	Corylus maxima 154-1
Hydrocarbures libres	19 (1969) 28,5 (1968) 13,8 (1967)	17,5 (1969) 10,4 (1968) 12,3 (1967)	- 19,9 (1968) 12,7 (1967)
Hydrocarbures liés	14,0 (1969) 18,6 (1968) 13,1 (1967)	16,8 (1969) 22,0 (1968) 15,3 (1967)	21,6 (1969) 12,4 (1968) 17,1 (1967)

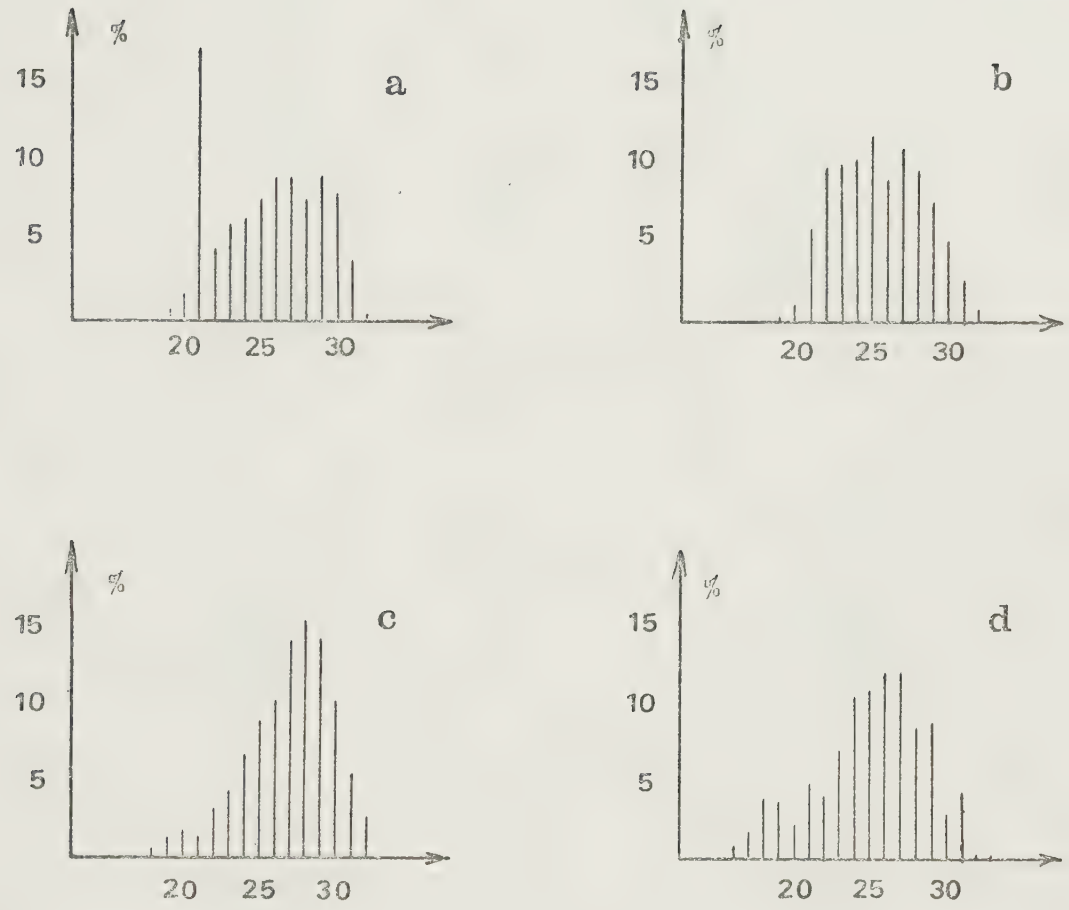


Fig. 8 - Distribution des alcanes "liés" de C. avellana Longue d'Espagne

a) 26 mai
b) 28 juin
c) 12 juillet
d) 30 août

(Résultats en % des hydrocarbures totaux).

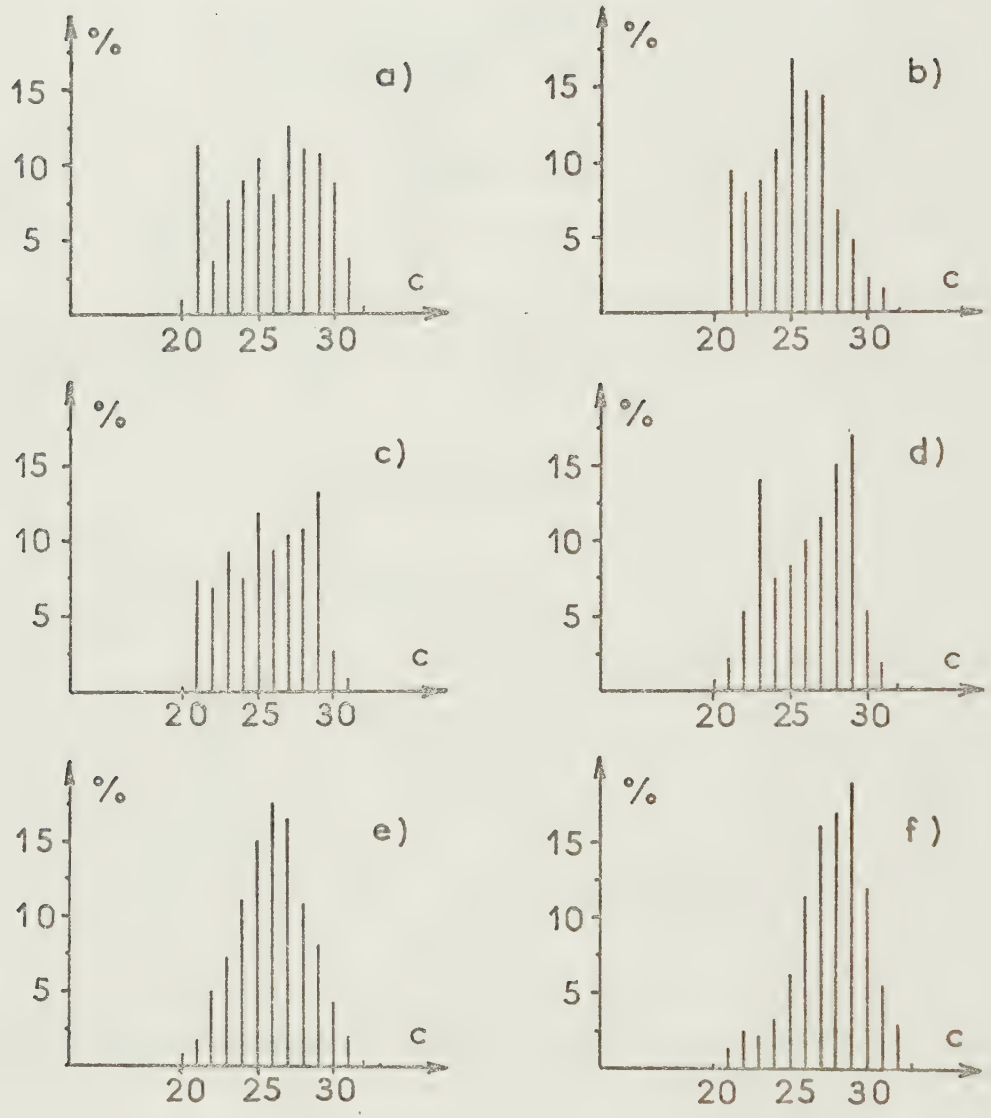


Fig. 7 - Distribution des alcanes liés de C. avellana Longue d'Espagne en % des hydrocarbures totaux.

a) 26 mai
b) 8 juin
c) 28 juin
d) 12 juillet
e) 24 juillet
f) 30 août

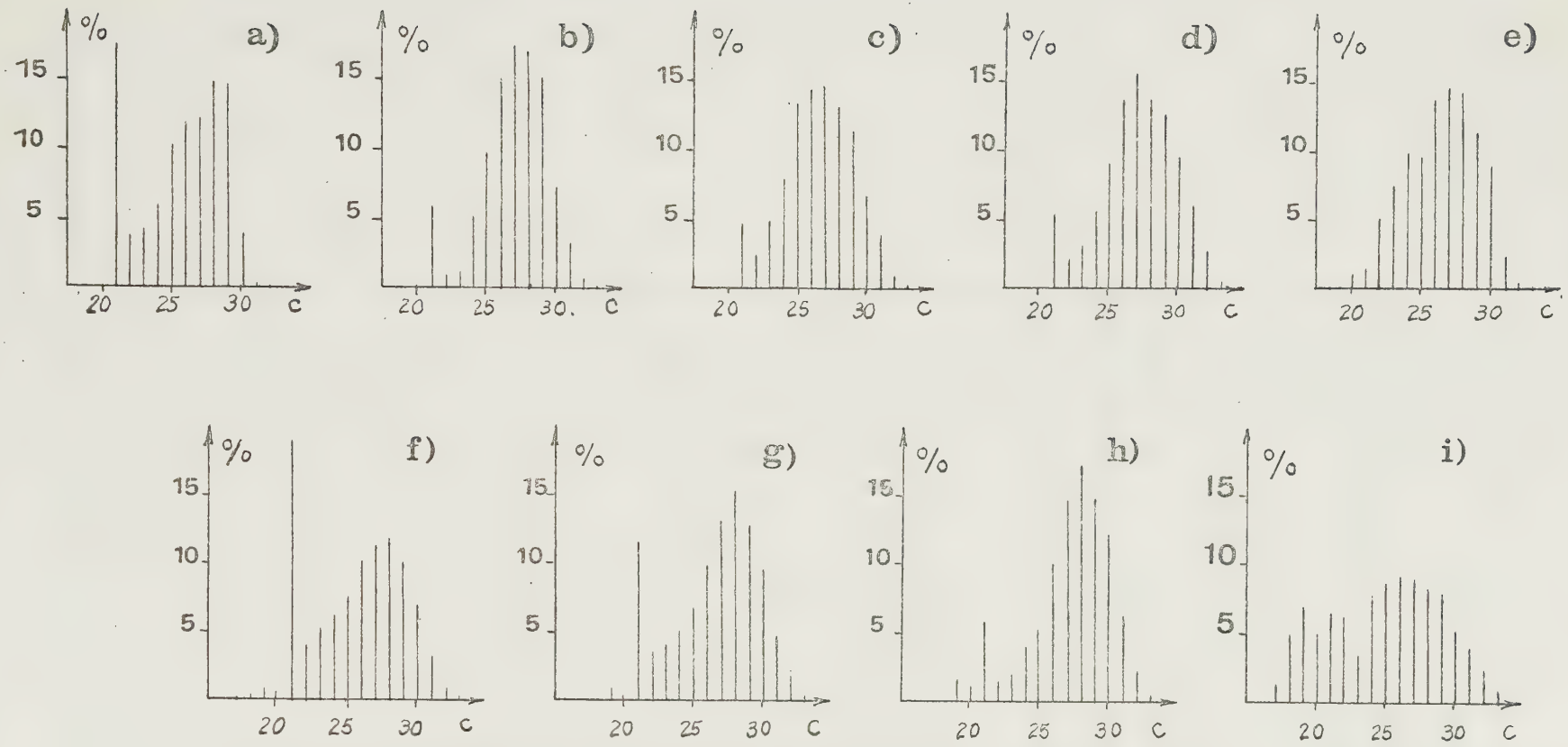


Fig. 10 - Distribution des hydrocarbures de l'Impériale de Trébizonde.
(en % des hydrocarbures totaux).

Hydrocarbures "libres"

a) 26 mai

b) 28 juin

c) 12 juillet

d) 24 juillet

e) 30 août

Hydrocarbures "liés"

f) 26 mai

g) 28 juin

h) 12 juillet

i) 30 août

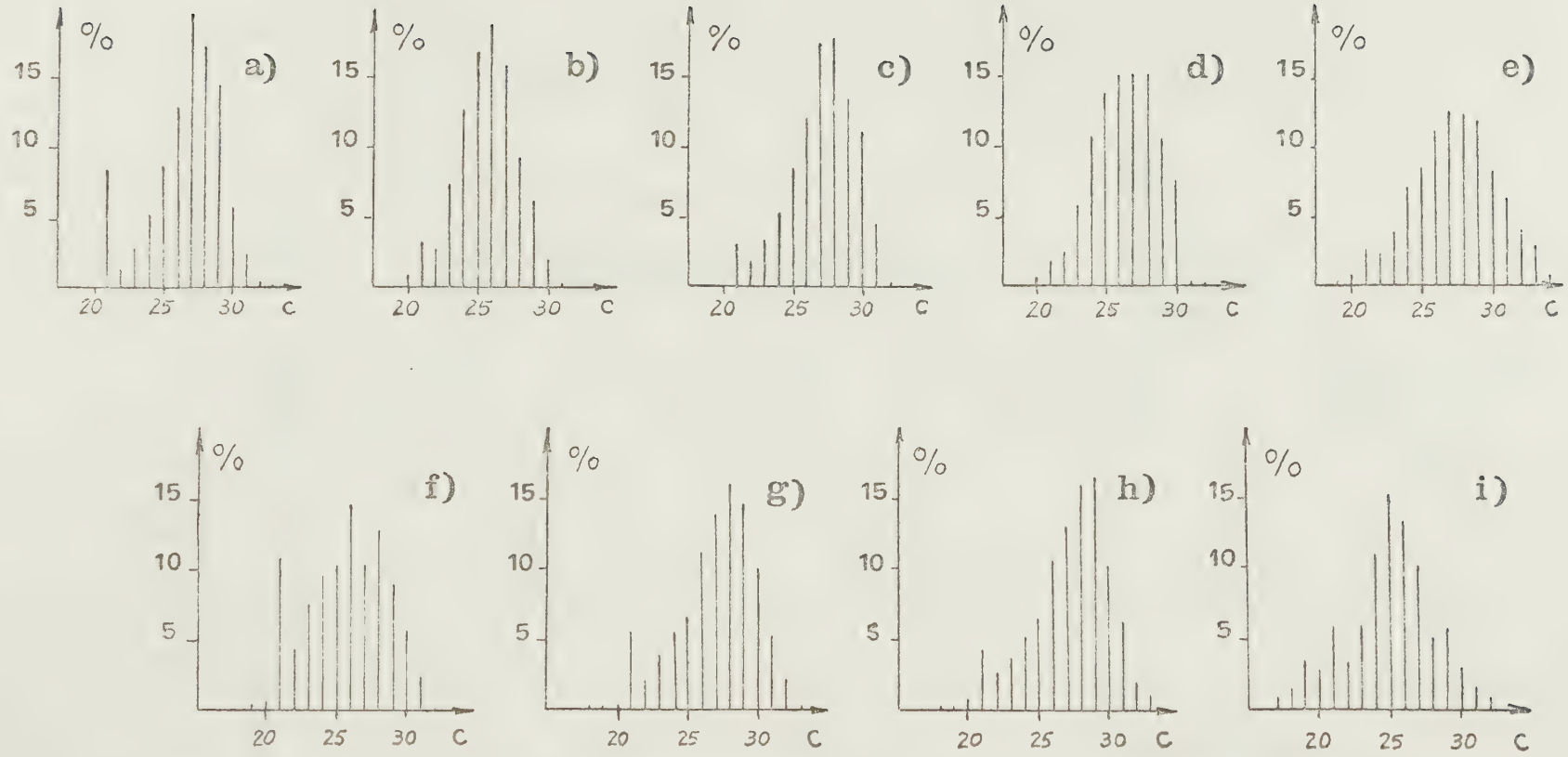


Fig. 9 - Distribution des hydrocarbures de C. maxima. (En % des hydrocarbures totaux).

Hydrocarbures "libres"

a) 26 mai

b) 28 juin

c) 12 juillet

d) 24 juillet

e) 30 août

Hydrocarbures"liés"

f) 26 mai

g) 28 juin

h) 12 juillet

i) 30 août

Ces taux n'ont pu être déterminés avec précision pour les lipides des prélèvements antérieurs en raison des trop faibles quantités obtenues ; on remarque la forte proportion d'hydrocarbures extractibles au méthanol. Pour vérifier si la présence d'hydrocarbures dans les lipides"liés" n'est pas simplement due à une extraction incomplète par l'éther, plusieurs essais ont été réalisés, en augmentant la durée de l'extraction par l'éther éthylique : quelle que soit la durée de l'extraction après 48 h, on n'extrait pas davantage d'hydrocarbures et seule une extraction au méthanol permet d'obtenir les hydrocarbures"liés" ; ce fait semble bien montrer l'existence d'au moins deux pools distincts d'hydrocarbures.

b) Composition moléculaire des mélanges d'hydrocarbures :

Les pourcentages des divers hydrocarbures au sein du mélange sont portés sur les figures 7, 8, 9 et 10.

L'examen de ces résultats amène quelques remarques :

1°) Les hydrocarbures qui figurent à des taux importants ont toujours de 24 à 30 atomes de carbone.

2°) Les hydrocarbures pairs et impairs ont des pourcentages comparables ; cela implique que si les hydrocarbures se forment par élongation et décarboxylation d'un acide gras, il est nécessaire de mettre en évidence des acides gras impairs à des taux comparables à ceux des acides pairs.

3°) On n'observe pas la très forte prédominance d'un carbure (comme c'est le cas chez Brassica oleracea) mais au contraire un ensemble de composés d'importance à peu près égale.

4°) Les fluctuations observées au cours du temps ont l'air statistique et ne semblent pas dues à la superposition de plusieurs mécanismes.

5°) Les hydrocarbures des fractions "libre" et "liée" ont des compositions différentes ; ainsi les hydrocarbures à bas poids moléculaire (ayant de 16 à 20 atomes de carbone) qui ne représentent pas en moyenne plus de 1 % du total dans la fraction libre à maturité, interviennent pour 10 à 20 % dans la fraction "liée, où l'on observe un "étalement" beaucoup plus grand des carbures, avec des taux de l'ordre de 10 % ; d'autre part dans la fraction liée, on note un changement important entre le 12 juillet et le 20 août : une augmentation des taux en carbures légers au détriment des carbures plus lourds ; on peut se demander si cela ne correspond pas à un contrôle par la température de la synthèse des hydrocarbures.

6°) Le fait qu'une forte partie des alcanes ne soit extractible que par un solvant polaire tel que le méthanol, paraît particulièrement important. Peu d'auteurs jusqu'à présent semblent s'être attachés à ce point. M. Fabre-(1969) a étudié les hydrocarbures des lipides libres et liés de certaines variétés de levures ; Albro et Dittmer (1969a) ont également noté dans Sarcina lutea la présence d'hydrocarbures seulement extractibles par des solvants polaires ; selon ces auteurs on peut envisager dans cette bactérie deux pools distincts d'hydrocarbures, distingués par leur facilité d'extraction ; mais les deux fractions qu'ils obtiennent ont la même composition. Baraud et al. (1965) ont observé qu'après épuisement de la poudre de maïs par l'hexane, le traitement au méthanol extrait des pigments caroténoïques et non seulement des caroténols, mais aussi des hydrocarbures caroténoïques, entrainés avec des protéines. Skipski et collaborateurs (1967) ont montré la présence d'hydrocarbures dans les lipoprotéines de sérum humain séparées par centrifugation ; la composition qu'ils observent est très régulière et les hydrocarbures pairs sont à des taux d'importance égale à celle des impairs : c'est également ce que l'on observe dans les hydrocarbures liés des cotylédons de noiset-

on peut envisager que les hydrocarbures de la fraction extractible au méthanol sont liés fortement aux lipoprotéines extraites en même temps, par liaisons hydrophobes ou interactions de Van der Waals entre les hydrocarbures et les restes aliphatiques des aminoacides, ou les chaînes aliphatiques des lipides ; si tel est le cas, un problème important sera d'élucider leur rôle au sein de ces lipoprotéines.

CONCLUSIONS DES CHAPITRES II et III

L'étude des acides gras et des hydrocarbures dans les graines de trois variétés de Corylus à divers stades de développement, nous a montré qu'il n'y a pratiquement aucune relation entre ces deux catégories de composés :

1°) Les hydrocarbures ont de 20 à 33 atomes de carbone, les pairs étant aussi abondants que les impairs.

2°) Le maximum se situe vers C_{29} pour les alcanes, C_{18} pour les acides gras ; cependant dans les lipoprotéines de l'albumen on observe des acides jusqu'à C_{24} et de C_{20} à C_{24} les pairs et les impairs ont la même importance.

3°) L'évolution des alcanes est très différente de celle des acides gras, pour lesquels on pouvait penser à la superposition de deux mécanismes, dont l'un n'est observable que dans l'albumen ; de plus les acides "liés" subissent à peu près les mêmes variations au cours du temps que les acides gras "libres" ; les phénomènes observés pour les paraffines ne permettent pas une telle interprétation.

4°) Il n'y a aucune corrélation entre l'insaturation croissante des acide gras et les alcanes : à aucun moment, on ne note pour ceux-ci une formation important de dérivés éthyléniques.

On peut a priori envisager les cas suivants :

1) Si l'on admet que les alcanes se forment par condensation de deux acid gras, comme l'ont montré Albro et Dittmer (1969a), on devrait obtenir au début de l synthèse les alcanes C_{27}, C_{29} et C_{31} essentiellement, puisC27, C33:1 etC35:2. Or la composition en hydrocarbures reste constante.

2) Si les alcanes sont synthétisés à partir d'un acide gras à très longu

chaîne (Kolattukudy 1967, 1968c) il faut mettre en évidence ces acides : on les observe dans les premiers prélèvements donc dans les lipides de l'albumen, mais à des taux très faibles et jusqu'au C_{24} seulement.

3) Il est possible encore que les acides gras et les hydrocarbures ne soient reliés que par un site commun de synthèse (Kolattukudy 1968a).

4) Enfin, les taux en alcanes observés sont toujours très faibles par rapport aux acides gras : il est possible que les alcanes se forment à partir d'un système enzymatique autonome presque totalement masqué. Cette possibilité serait une extension de l'hypothèse d'élongation de Kolattukudy.

Pour vérifier ou infirmer ces diverses hypothèses, nous avons étudié les feuilles de Corylus dont les cires cuticulaires renferment une plus grande quantité d'hydrocarbures.

chapitre IV

ETUDE DES ACIDES GRAS ET DES HYDROCARBURES DES FEUILLES DE CORYLUS

I - INTRODUCTION

Le revêtement des épidermes des parties aériennes dans les végétaux supérieurs forme un complexe cuticulaire dans lequel se trouvent les cires (Mazliak 1969). On entend généralement par cires, non seulement les cérides et stérides, mais aussi les aldéhydes, les cétones, les alcools, tous composés à longue chaîne, et les hydrocarbures saturés et éthyléniques, à chaîne droite ou ramifiée ; en fait les hydrocarbures sont surtout abondants dans les cires cuticulaires des feuilles ; un rôle possible est la protection des feuilles et pétioles contre les attaques fongiques, et l'élaboration d'un système assez souple permettant le dégagement de vapeur d'eau et les échanges gazeux.

Des travaux consacrés à l'étude des lipides cireux, on peut dégager les caractères suivants : la composition en hydrocarbures est extrêmement variable, mais le plus souvent on rencontre des alcanes à nombre impair d'atomes de carbone, essentiellement les heptacosane, nonacosane et hentriacontane à chaîne droite ; les acides gras ont presque toujours de 22 à 30 atomes de carbone, les acides impairs étant très peu représentés.

Radler et Horn (1965), Radler (1967) étudiant la cire de la baie de raisin, ont mis en évidence les paraffines de C_{18} à C_{35}, avec une forte prédominance des impairs, et les acides gras de C_{14} à C_{32}, surtout pairs. Mazliak (1961) observa dans Copernicia cerifera, des acides gras à 24, 26, 28 et 30 atomes de carbone, alors que les alcanes ont une répartition régulière et présentent un maximum vers le C_{29} ; Mazliak (1963) a montré la présence des acides à longue chaîne jusqu'à C_{30} dans la cire cuticulaire des pommes ; la fraction hydrocarbures renferme essentiellement le nonacosane. Selon Eglinton et Hamilton (1963) la cire cuticulaire d'Aeonium lindleyi renferme des paraffines dont les plus abondantes ont 29, 31 et 33 atomes de carbone ; à noter dans cet exemple, une très forte proportion de composés ramifiés, à la fois dans les hydrocarbures et les acides gras. Kranz et al. (1960) ont montré que l'alcane prépondérant de Saccharum officinarum est l'heptacosane, alors que l'acide principal est l'acide octacosanoïque.

La plupart de ces auteurs observent des acides gras presque uniquement pairs, mais ce n'est pas toujours le cas : Kolattukudy (1968c) a étudié la biosynthèse des paraffines dans les feuilles de Nicotiana tabacum et Senecio odoris ; il a pu montrer la présence d'acides gras linéaires et ramifiés jusqu'à C_{27}, où les acides pairs et impairs sont d'égale importance.

Nous avons, pour notre part, envisagé la composition en acides gras et hydrocarbures des cires cuticulaires des épidermes supérieur et inférieur, puis des lipides internes, séparés de nouveau en lipides "libres" et "liés" des feuilles de Corylus.

II - TECHNIQUE D'ETUDE

a) Extraction des lipides :

Pour les cires, elle est généralement réalisée à l'aide d'un solvant tel que le chloroforme. Selon Hall et Donaldson (1962), les cires de Trifolium repens sont extraites en une nuit au chloroforme ; le même résultat est obtenu pour Brassica oleracea en dix minutes. En fait, l'extraction des cires est généralement beaucoup plus rapide : pour Kolattukudy (1965), les cires de Brassica oleracea sont entièrement extraites en plongeant les feuilles pendant trente secondes dans le chloroforme ; de plus, 99 % des lipides extraits en une minute le sont en dix secondes ; en poursuivant l'extraction pendant deux minutes, on ne récupère que des traces infimes de lipides.

1 - Extraction des lipides de la cire cuticulaire :

Les clônes étudiés sont ceux de C. avellana Longue d'Espagne N 27-3, C. maxima 154-1, Impériale de Trébizonde 103-2. Sur chaque clône, on prélève de 150 à 250 g de feuilles fraiches, dont on fait deux lots. Du premier lot, les lipides cuticulaires de l'épiderme supérieur sont extraits par ruissellement de chloroforme sur cet épiderme ; il faut de 600 à 800 ml de chloroforme pour 100 g de feuille fraîche. On extrait de la même façon les lipides de l'épiderme inférieur à partir du deuxième lot. Les extraits chloroformiques sont lavés, séchés sur sulfate de sodium, le solvant est éliminé et le résidu pesé ; nous avons vérifié que l'extraction est pratiquement totale : en plongeant des feuilles pendant cinq minutes dans le chloroforme, on obtient une quantité de cires qui est la somme des lipides des épidermes supérieur et inférieur obtenus séparément.

2 - Extraction des lipides internes :

Les deux lots de feuilles de chaque clône sont réunis et les feuilles sont plongées pendant cinq minutes dans le chloroforme pour éliminer les lipides de l'épiderme non extrait ; les feuilles sont broyées, et les lipides internes en sont extraits à l'éther éthylique en soxhlet pendant 48 heures. Les lipides ainsi obtenus sont lavés, séchés sur sulfate de sodium, le solvant est éliminé et le résidu pesé.

Le résidu d'extraction à l'éther est traité de nouveau en soxhlet au reflux du méthanol pendant douze heures pour extraire les lipides des lipoprotéines ; ces lipides liés sont ceux du parenchyme et des épidermes ; les taux des lipides des différentes fractions sont portés dans le tableau IV.

Tableau IV

TAUX en LIPIDES des DIFFERENTES PARTIES de la FEUILLE

(en % par rapport au poids de feuilles fraiches)

	C. Maxima	Longue d'Espagne	Impériale de Trébizonde
Lipides cuticulaires de l'épiderme supérieur	0,16	0,11	0,15
Lipides cuticulaires de l'épiderme inférieur	0,14	0,27	0,31
Lipides internes "libres"	0,92	1,14	0,74
Lipides internes "liés"	0,61	0,81	0,70

Dans ce tableau, la teneur en lipides "liés" a été estimée par addition des masses d'acides gras et d'insaponifiable ; le chiffre ainsi obtenu est plus proche de la réalité car l'extrait méthanolique contient toujours de très importantes quantités de constituants non lipidiques, en particulier des protéines. Les taux en lipides sont 4 à 5 fois plus élevés dans la partie interne de la feuille que dans les cuticules.

b) Préparation des esters méthyliques et de la fraction des hydrocarbures

Les esters des différentes fractions ont été préparés de la façon décrite précédemment : saponification, extraction de l'insaponifiable et estérification des acides gras par le méthanol en présence de trifluorure de bore.

L'insaponifiable a été chromatographié sur une colonne d'alumine activée, éluée à l'hexane ; après chromatographie, le solvant est évaporé et le résidu pesé. Les taux en hydrocarbures sont donnés dans le tableau V.

Tableau V

TAUX en HYDROCARBURES des DIFFERENTES PARTIES de la FEUILLE
(en % par rapport aux lipides)

	C. Maxima	Longue d'Espagne	Impériale de Trébizonde
Cuticules de l'épiderme supérieur	7,8	5,4	7,8
Cuticules de l'épiderme inférieur	3,6	5,0	2,5
Lipides internes "libres"	1,8	1,3	1,4
Lipides internes "liés"	0,9	0,8	1,4

Tableau VI

COMPOSITION en HYDROCARBURES et ACIDES GRAS des DIFFERENTES PARTIES de la FEUILLE de *C. avellana* Longue d'Espagne

(en % du total)

Acides	Epiderme supérieur		Epiderme inférieur		Lip. internes "libres"		Lip. internes "liés"	
	Acides Gras	Hydrocarbures	Acides Gras	Hydrocarbures	Acides Gras	Hydrocarbures	Acides Gras	Hydrocarbures
C10	-		t		1,3		t	
C11	-		-		t		t	
C12	t		t		7,1		5,2	
C13	-		-		t		-	
C14	0,6		0,4		4,5		6,0	
C14:1	0,3							
C15	0,1	-	t	-	t	-	t	-
i C16	0,2	-	-	-	0,5	-	t	-
C16	2,8	0,2	1,6	0,8	14,6	0,1	26,8	t
C16:1	1,9	-	8,7	-	-	-	6,5	-
C17	t	0,4	t	1,4	t	0,1	1,0	1,3
i C18	-	-	-	-	0,9	-	-	-
C18	2,2	0,5	0,8	1,6	3,0	0,2	4,7	0,9
C18:1	0,9	-	0,2	-	1,1	-	9,4	-
C18:2	-	-	-	-	1,3	-	10,2	-
C19	0,1	0,8	0,3	1,1	-	0,7	-	2,2
i C20	-	-	-	-	-	-	-	1,0
C20	2,4	1,0	1,9	1,2	3,2	1,0	15,8	0,6
C20:1	0,8	-	t	-	-	-	-	-
C21	1,4	1,6	0,3	5,1	0,9	0,7	1,2	2,1
i C22	-	0,3	-	0,9	-	0,2	-	-
C22	5,5	15,1	7,3	7,7	4,9	3,9	1,4	7,0
C22:1	1,5	-	1,0	-	-	-	2,4	-
C23	1,4	1,4	0,5	3,4	0,5	1,1	3,0	2,2
i C24	1,8	-	t	-	-	-	-	-
C24	12,2	1,2	28,2	3,2	24,5	1,0	2,3	3,5
C24:1	6,6	-	5,1	-	3,0	-	-	-
C25	16,1	1,2	13,1	5,2	10,7	2,7	2,8	6,4
C26	22,0	3,5	21,3	2,9	15,5	1,4	1,3	3,6
C26:1	6,3	-	2,0	-	-	-	-	-
i C27	-	3,0	-	t	-	0,7	-	-
C27	5,5	6,9	4,5	4,3	-	6,6	-	7,5
i C28	-	-	-	1,0	-	-	-	-
C28	5,7	5,9	2,8	3,1	2,5	2,8	-	6,5
C29	t	34,2	t	32,1	-	46,0	-	35,5
C30	1,7	3,9	t	3,0	-	5,0	-	3,5
C31	-	16,4	-	21,0	-	23,0	-	13,2
C32	-	1,9	-	1,0	-	1,1	-	t
C33	-	t	-	t	-	0,6	-	t

Tableau VII

COMPOSITION en HYDROCARBURES et ACIDES GRAS des DIFFERENTES PARTIES DE LA FEUILLE de C. maxima

(en % du total)

	Epiderme supérieur		Epiderme inférieur		Lip. internes "libres"		Lip. internes "liés"
	Acides gras	Hydrocarbures	Acides gras	Hydrocarbures	Acides gras	Hydrocarbures	Acides gras
C10	-	-	-	-	1,5	-	0,4
C11	-	-	-	-	0,4	-	-
C12	3,7	-	0,2	-	12,0	-	12,8
C13	3,7	-	0,2	-	-	-	-
C14	3,6	-	0,1	-	7,5	-	8,3
C15	-	-	0,1	-	0,6	-	-
C16	10,7	0,7	2,5	0,6	26,4	0,1	28,9
C16:1	2,8	-	1,6	-	0,6	-	2,9
C16:2	-	-	-	-	-	-	3,2
C17	0,6	1,1	0,5	0,8	0,1	0,2	t
i C18	-	-	-	-	0,2	-	-
C18	6,4	1,0	2,2	0,6	3,8	0,2	5,6
C18:1	2,9	-	1,1	-	5,3	-	6,3
C18:2	2,9	-	0,2	-	7,4	-	6,6
C18:3	-	-	0,1	-	10,0	-	-
C19	-	2,1	0,1	0,8	0,6	0,5	-
C20	1,9	2,6	1,8	1,1	0,6	0,3	12,7
C21	0,7	2,8	0,5	1,3	-	0,8	-
i C22	-	0,9	-	0,5	0,6	0,2	-
C22	4,1	3,5	5,9	6,7	2,0	4,0	0,6
C22:1	0,7	-	1,9	-	-	-	-
C23	-	2,4	6,6	1,0	0,8	1,5	-
i C24	-	-	-	-	5,4	-	-
C24	23,9	2,5	15,6	1,0	11,1	1,6	-
C24:1	3,7	-	3,9	-	-	-	-
C25	4,8	5,7	24,1	4,8	3,1	5,1	7,5
C26	22,9	7,2	15,4	1,6	t	2,8	4,2
C26:1	-	-	2,0	-	-	-	-
i C27	-	9,2	-	5,3	-	0,6	-
C27	t	12,0	7,7	8,3	-	8,0	-
i C28	-	-	-	1,4	-	-	-
C28	-	9,6	4,3	2,9	-	9,7	-
C29	-	18,7	t	37,3	-	40,7	-
C30	-	6,3	1,4	2,9	-	5,3	-
C31	-	8,3	-	19,3	-	17,1	-
C32	-	2,1	-	0,5	-	0,5	-
C33	-	1,3	-	1,3	-	0,3	-

Tableau VIII

COMPOSITION en HYDROCARBURES et ACIDES GRAS des DIFFERENTES PARTIES de la FEUILLE de l'HYBRIDE IMPERIALE de TREBIZONDE
(en % du total)

Acides	Epiderme supérieur		Epiderme inférieur		Lip. internes "libres"		Lip. internes "liés"
	Acides gras	Hydrocarbones	Acides gras	Hydrocarbures	Acides gras	Hydrocarbures	Acides gras
C10	0,5	-	t	-	0,8	-	0,8
C12	1,2	-	t	-	7,7	-	3,7
C13	2,9	-	-	-	-	-	-
C14	1,6	-	1,9	-	8,7	-	9,0
C15	1,1	-	t	-	0,8	-	t
C16	9,7	1,3	3,2	0,3	10,2	0,4	38,7
C16:1	11,3	-	0,4	-	t	-	6,4
C17	0,3	1,2	-	0,2	0,6	0,6	1,6
i C18	0,9	-	-	-	-	-	-
C18	5,0	1,0	1,1	0,4	4,4	0,7	3,2
C18:1	1,4	-	0,3	-	2,0	-	4,8
C18:2	0,9	-	0,4	-	1,0	-	8,2
C19	0,6	1,0	0,3	0,7	-	2,4	-
i C20	-	-	0,3	-	-	-	-
C20	1,9	1,6	2,3	0,7	5,2	1,1	18,3
C20:1	-	-	0,3	-	1,3	-	-
C21	0,7	2,5	0,8	1,0	t	1,6	t
i C22	-	0,8	2,2	0,3	-	t	-
C22	5,5	5,1	4,8	7,5	4,9	4,0	0,8
C22:1	-	-	t	-	-	-	1,2
C23	0,4	0,5	4,5	1,0	6,1	2,1	0,9
i C24	-	-	4,5	-	-	-	-
C24	33,3	9,4	18,9	1,4	20,9	1,8	0,7
C24:1	-	-	1,1	-	-	-	-
i C25	-	-	0,8	-	-	-	-
C25	5,8	4,5	24,4	4,3	10,8	4,4	1,7
i C26	-	-	1,5	-	-	-	-
C26	13,3	8,7	13,8	1,9	14,6	2,8	t
i C27	-	14,4 (?)	-	1,9	-	0,6	-
C27	0,5	5,4	8,0	10,2	-	8,8	-
i C28	-	1,2	-	-	-	-	-
C28	1,1	4,5	4,2	3,4	t	6,0	-
C29	0,1	19,5	t	40,1	-	39,5	-
C30	-	4,7	t	3,3	t	3,8	-
C31	-	11,9	-	19,0	-	18,4	-
C32	-	0,8	-	1,0	-	0,8	-
C33	-	t	-	1,4	-	0,4	-

Ces taux en hydrocarbures sont moyens : il est fréquent de rencontrer des taux plus élevés. Naturellement, les hydrocarbures sont surtout localisés dans les cires épicuticulaires, mais il faut noter la présence d'alcanes à des taux élevés dans les lipides internes. D'autre part, l'épiderme inférieur est moins riche en hydrocarbures que l'épiderme supérieur.

c) Chromatographie en phase gazeuse :

Les analyses des esters méthyliques ont été réalisées dans les conditions suivantes :

1) F & M 810 à ionisation de flamme

Colonne de DEGS à 5 % sur chromosorb G (AW 60/80), 2 m, 1/4 pouce

Température du four : 205° C.

2) F & M 5750 à ionisation de flamme

Colonne de D.E.G.S. à 5 % sur chromosorb G (AW 60/80), 1,5 m, 1/8 pouce

Température du four : 205° C

Colonne UCC 982 à 10 % sur chromosorb DMCS, 2 m, 1/8 pouce

Les hydrocarbures ont été analysés et dosés dans les conditions déjà décrites.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats donnant la répartition des divers acides gras et hydrocarbures dans les quatre fractions lipidiques analysées sont portés dans les tableaux VI, VII et VIII.

Dans les cires cuticulaires, on note la présence d'acides gras à très longue chaîne (jusqu'à 30 atomes de carbone) ; les acides de condensation inférieur

à 20 atomes de carbone interviennent pour moins de 20 % du total ; on observe des quantités importantes de C_{24}, C_{25} et C_{26} et des taux de l'ordre de 5 % de C_{22}, C_{27} et C_{28} ; tous les acides gras sont représentés, les acides impairs étant à des taux généralement inférieurs à ceux des pairs ; toutefois, l'acide pentacosanoïque a des teneurs souvent très importantes. La chromatographie à différentes températures, sur colonnes polaire et apolaire nous a permis de l'identifier avec certitude. Il est également remarquable dans les cires que tous les acides insaturés sont pairs. Avec une colonne de D.E.G.S., nous n'avons pu mettre en évidence d'acides gras de condensation supérieure à C_{30}, car nous étions à la limite des possibilités des colonnes de D.E.G.S. utilisées. Par contre, avec une colonne de UCC 982, en programmant la température, il est possible de mettre en évidence l'acide dotriacontanoïque, présent dans les cires à des taux extrêmement faibles.

Dans les lipides internes, on remarque une forte augmentation des taux en acides plus légers, tels les acides palmitique, stéarique et oléique, qui dans le cas de C. maxima représentent plus de 50 % du total ; les acides à longue chaîne sont cependant encore présents jusqu'à C_{26} et même C_{28} dans le cas de C. avellana Longue d'Espagne.

Dans la fraction "liée", qui renferme des acides provenant des lipides internes et des épidermes, il y a un net accroissement des taux en acides palmitique (qui devient le constituant majeur), oléique et linoléique.

Les hydrocarbures des épidermes ont des compositions nettement différentes de celles des cotylédons : les paraffines impaires sont prépondérantes, surtout le nonacosane et le hentriacontane, mais tous les alcanes sont représentés. Les taux d'hydrocarbures dans les épidermes inférieurs sont plus faibles que ceux des

épidermes supérieurs ; de la même façon les hydrocarbures pairs y sont moins importants ; cette différence est moins marquée dans C. avellana Longue d'Espagne, où justement le taux en hydrocarbures de l'épiderme inférieur est voisin de celui de l'épiderme supérieur.

Les teneurs en hydrocarbures des cires sont environ 4 fois supérieures à celles des lipides internes ; ce fait pose la question de l'existence d'un site de synthèse des alcanes dans l'épiderme lui-même ; selon Mueller, Carr et Loomis (1954), la cire est probablement excrétée par des pores situés à la surface de la feuille ; Hall et Donaldson (1962) ont observé ces pores à la surface de Brassica oleracea.

Mais il existe des hydrocarbures dans les lipides internes "libres" et "liés" ; cela n'est pas surprenant : Gülz (1968) a mis en évidence des hydrocarbures dans des préparations de chloroplastes d'Antirrhinum majus ; d'autre part l'étude des cotylédons de noisettes nous a déjà montré l'existence d'alcanes seulement extractibles au méthanol.

CONCLUSIONS

Aucun des résultats obtenus ne permet d'envisager une synthèse des hydrocarbures par un mécanisme de condensation ; dans les cires cuticulaires, les acides gras importants ont tous de longues chaînes, mais ces acides gras sont-ils uniquement impliqués dans la synthèse des hydrocarbures ? Selon une observation de Kolattukudy (1968a) il est possible dans les feuilles de pois et d'épinard que le seul point commun à ces deux catégories de constituants soit une localisation identique de leur site de synthèse.

Les lipides internes des feuilles de Corylus ont des alcanes de composition voisine de celle des épidermes. Les acides gras à longue chaîne sont d'autant plus abondants que les taux en hydrocarbures sont plus forts ; de plus on observe nettement une prédominance des acides gras pairs et des hydrocarbures impairs, à chaîne droite ; on peut penser qu'il existe une relation entre ces deux séries de composés ; de même, dans Aeonium lindleyi les acides et les alcanes présentent tous deux des proportions élevées et comparables de dérivés ramifiés (Eglinton et Hamilton, 1963).

Mais les teneurs en acides gras et alcanes ne sont pas exactement parallèles ; les fluctuations dans les taux pourraient alors être dues soit à un contrôle cinétique des différentes réactions du système enzymatique soit à une spécificité de ce système, dont Kolattukudy a donné un bon exemple (1968b) : dans les feuilles de Brassica oleracea, les composés ramifiés sont peu incorporés dans les paraffines alors que Nicotiana tabacum accepte aussi bien les précurseurs ramifiés ou à chaîne droite.

Pour nos études ultérieures, nous avons recherché un végétal d'utilisation plus souple que le noisetier, répondant à un certain nombre de conditions et permettant d'effectuer des expériences de biosynthèse en présence de précurseurs marqués isotopiquement.

DEUXIÈME PARTIE

INTRODUCTION

En vue de préciser le mécanisme de biosynthèse des hydrocarbures, nous avons effectué diverses expériences d'incorporation de précurseurs marqués dans les lipides d'Allium porrum L. Cette liliacée est trop connue pour qu'il soit utile de la décrire. Elle peut être cultivée en serre ou au laboratoire pendant toute l'année, et l'on peut prélever mécaniquement les épidermes pour une étude particulière. Le choix de ce végétal a été envisagé pour les raisons suivantes :

Un examen préliminaire montre que les cires épicuticulaires ont des taux de l'ordre de 1 ‰ du poids frais de feuilles. Les hydrocarbures représentent de 10 à 15 % du total des lipides superficiels. Les paraffines à nombre pair d'atomes de carbone sont en quantité moins importantes que celles à nombre impair. On rencontre également, à des taux extrêmement faibles, des alcanes ramifiés. Les taux relatifs des différents hydrocarbures sont très variables selon les conditions de culture et l'âge du plant. Ainsi au cours du vieillissement du plant, on observe un accroissement du taux en hydrocarbures à très longue chaîne impaire, essentiellement C_{29}, C_{31}, C_{33}. La présence de composés pairs et impairs, éventuellement ramifiés, est favorable à l'étude d'un mécanisme général de biosynthèse ; l'absence de dérivés pairs, par exemple, est un cas trop particulier et le cas fréquent où les hydrocarbures sont essentiellement composés de C_{29} ou de C_{31} pose de nombreux problèmes pour l'interprétation des résultats. Aussi sur A. porrum L, peut-on espérer avoir une vue d'ensemble du phénomène.

Nous avons étudié sur des plants de 2 à 7 mois, l'incorporation dans les alcanes d'acétate de sodium 2-^{14}C et U-^{14}C, de propionate de sodium, d'isobutyrate de sodium et de valine. Les résultats de ces expériences font l'objet de cette deuxième partie.

chapitre I

ETUDE DES ACIDES GRAS ET DES HYDROCARBURES D'ALLIUM PORRUM

I - EXTRACTION DES LIPIDES

a) Cires épicuticulaires :

Nous avons tout d'abord vérifié que les cires sont entièrement extraites au chloroforme en moins de 10 minutes. Pour déterminer la durée optimum de l'extraction, nous avons effectué une étude en fonction du temps ; les feuilles d'um plant de 7 mois sont coupées en morceaux de 7 cm de long et plongées dans le chloroforme pendant des temps variables. Puis la solution chloroformique est lavée et séchée. Le solvant est éliminé et le résidu pesé. Les résultats sont portés dans la figure 11.

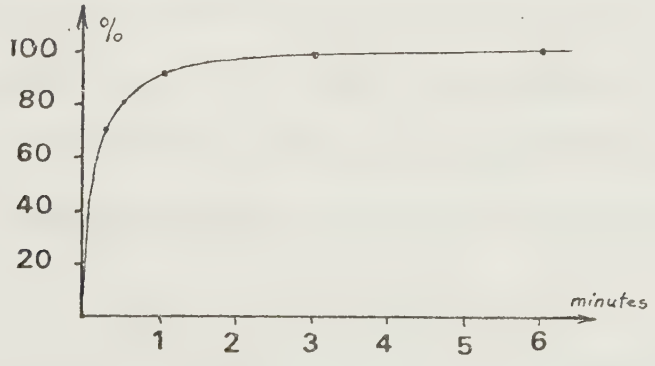


Fig. 11 - Extraction des lipides épicuticulaires d'Allium porrum

On voit que l'extraction est extrêmement rapide : en 15 secondes, on recueille 70 % de cires, en une minute près de 90 %. L'extraction est totale en 5 minutes.

b) Lipides internes :

Les feuilles débarrassées de leurs lipides épicuticulaires sont coupées en carrés de 0,5 cm de côté et les lipides internes en sont extraits en soxhlet pendant 48 h, au reflux du méthanol. Les lipides internes contiennent en particulier les lipides des chloroplastes, les lipides "liés" des épidermes et les lipides vacuolaires.

II - ETUDE DES ESTERS METHYLIQUES

Les esters méthyliques ont été préparés de la façon précédemment décrite. Les esters méthyliques ont été chromatographiés sur colonne de D.E.G.S. à 10 % à 200° C et UCC 982 à 10 % à 285° C. La présence d'une forte quantité d'acides de bas poids moléculaire (de C_8 à C_{18}) a rendu nécessaire une étude particulière. La meilleure séparation a été obtenue de la façon suivante :

Appareil F & M 5750 à ionisation de flamme

Colonne acier inoxydable 6 pieds, 1/8 pouce

Remplissage : UCC 982 10 % sur chromosorb W 60/80

Température de départ 206° C - intervalle post injection 4 minutes

Programmation 4°/minute jusqu'à 295° puis isotherme.

On met en évidence les acides gras jusqu'à C_{32} (tableau IX).

Tableau IX

ACIDES GRAS des LIPIDES SUPERFICIELS

Acides	Taux	Acides	Taux
C 8	0,6	C 18	6,7
C 10	0,1	C 18:1	14,4
C 11	0,6	C 19	1,9
C 12	11,8	C 20	1,8
C 12:1	4,2	C 21	0,5
C 13	0,6	C 22	3,5
i C 14	t	C 23	0,5
C 14	8,4	C 24	1,0
C 14:1	3,5	C 25	0,7
C 15	2,7	C 26	1,4
C 15:1	1,2	C 27	0,4
i C 16	0,8	C 28	3,4
C 16	15,7	C 29	0,5
C 16:1	12,4	C 30	0,05
C 17	0,5	C 31	0,1
		C 32	0,05

III - ETUDE DES ALCANES

Les hydrocarbures ont été préparés de la façon précédemment décrite. La pureté de la fraction a été vérifiée par étude dans l'infra-rouge : toutes les bandes observées sont attribuables à des alcanes. L'analyse par CPG est réalisée sur colonne UCC 982 à 250 et 280° C. Les chromatogrammes obtenus montrent la présence à l'état de traces d'une série d'hydrocarbures dont les "longueurs de chaîne équivalentes" sur UCC 982 à 278° C correspondent à n - 0,5 atomes de carbone entre C_{18} et C_{29}. Nous avons cherché s'il s'agissait de dérivés ramifiés.

En effet, la présence d'alcanes ramifiés dans les cires est connue. Jarolimek et al. (1964) les mettent en évidence dans Populus nigra. Mold et coll. (1964) les ont étudiés dans la cire de la laine. Mold et al. (1963) les observent

dans la feuille de tabac. On les a également trouvés dans la canne à sucre (Sorm et al. 1964), dans Hypericum (Mathis et Ourisson 1964). La plupart des auteurs ont caractérisé les alcanes ramifiés uniquement par leur temps de rétention en CPG, généralement après passage sur tamis moléculaire de 5 Å; Kaneda (1967) a établi les spectres de masse de dérivés ramifiés, recueillis après passage sur tamis moléculaire des hydrocarbures de Nicotiana tabacum. De la même façon, Gülz (1968) a démontré leur présence dans les alcanes d'Antirrhinum majus.

Dans un premier temps, nous avons montré la présence de dérivés ramifiés dans les alcanes d'Allium porrum L par passage sur tamis moléculaire, selon la technique préconisée par O'Connor, Burow et Norris (1962). Puis nous avons réalisé les spectres de masse des différents pics séparés par CPG.

a) Séparation des hydrocarbures ramifiés par tamis moléculaire :

Nous n'avons pu disposer pour cette séparation que de tamis de 5 Å en poudre d'une efficacité très inférieure à celle du tamis moléculaire 5 Å Linde habituellement employé.

1°) Le tamis moléculaire est chauffé 6 h à 300° C, 4 h à 450° C. On laisse refroidir jusqu'à la température ambiante. L'isooctane (Matheson, Spectro-quality Reagent) est purifié par passage de 100 ml sur une colonne de 2,5 cm de diamètre contenant 15 g de tamis moléculaire. Le débit est de 2,5 ml/minute.

2°) Dans un ballon de 250 ml contenant 12 g de tamis moléculaire, on ajoute 11,5 mg d'alcanes dissous dans 50 ml d'isooctane. On chauffe 3 h au reflux du solvant, puis on abandonne une nuit à température ambiante. Après élimination du solvant, le résidu est chromatographié. Les résultats obtenus sont portés dans la figure 12. On note un net enrichissement en isoalcanes légers et une disparition

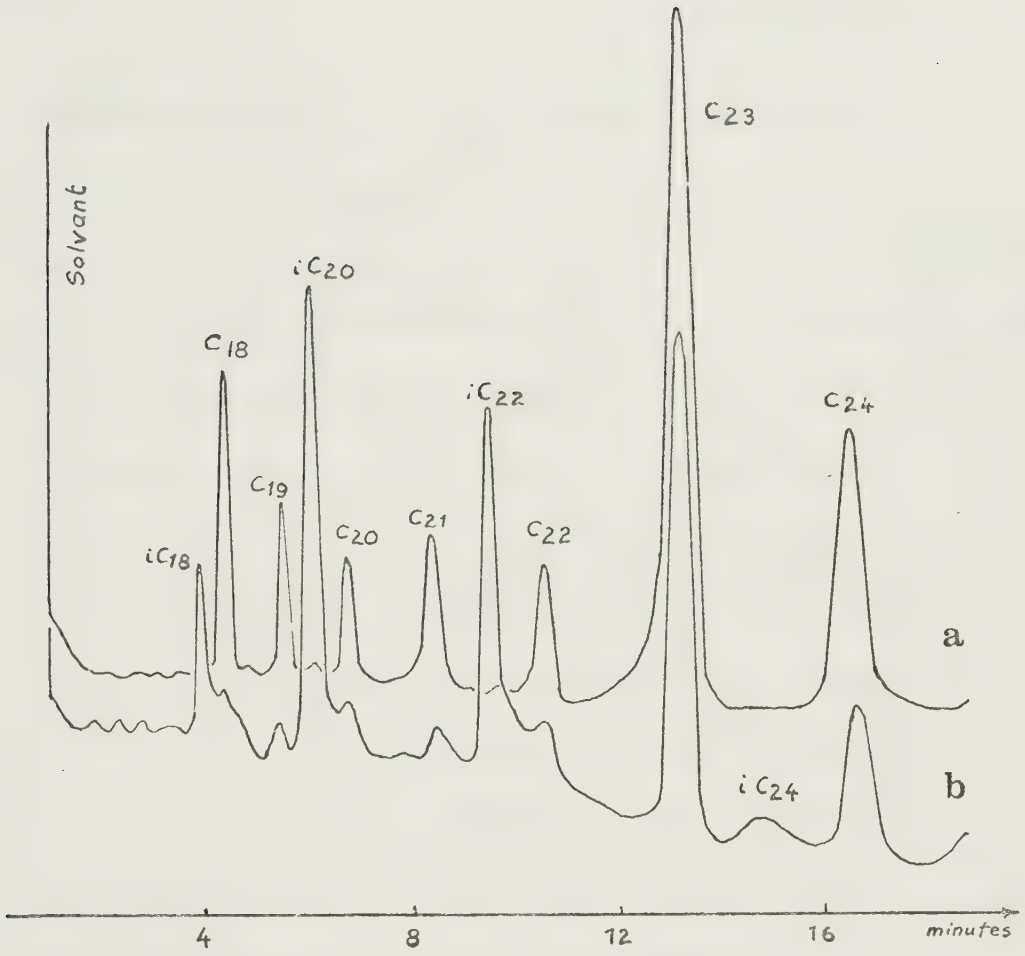


Fig. 12 - Chromatographie des alcanes d'Allium Porrum

a) avant tamis moléculaire

b) après tamis moléculaire

presque totale des chaînes droites jusqu'à C_{22}. Les longueurs de chaîne sont bien n - 0,5 dans les conditions décrites : il y a donc des isoalcanes dans les hydrocarbures d'Allium porrum L.

b) Spectrométrie de masse couplée à la CPG des hydrocarbures :

La présence de traces d'isoalcanes étant établie, il nous a paru intéressant de préciser davantage la structure de ces composés. Pour cela nous avons utilisé la CPG couplée à la spectrométrie de masse ; on peut espérer par cette technique connaître la nature des composés séparés par CPG.

Le spectromètre de masse est un A.E.I. MS 12 couplé à un chromatographe Pye par un séparateur de type Biemann

Colonne acier inoxydable 1/8 pouce, 6 pieds

Remplissage 10 % UCC 982 W sur chromosorb W

Gaz porteur Helium 25 ml/minute

Température four 250° C

Température séparateur 250° C

Les chromatogrammes (fig. 13) et les spectres de masse (fig. 14) ont été réalisés à 70 eV puis à 16 eV pour amplifier le pic moléculaire.

Les spectres de masse des n-alcanes de C_{22} à C_{31} ont été enregistrés à 70 eV. Dans les figures 14a et 14b, on a porté en exemple les spectres du n-nonacosane et du n-hentriacontane. On observe un pic moléculaire assez intense, puis une série de pics de fragmentation de formule générale C_nH_{2n+1} d'intensité décroissante quand la masse augmente. Ces résultats sont en bon accord avec ceux décrits par Beynon, Saunders et Williams (1968) et les résultats obtenus par Kaneda (1967)

Fig. 13 - C.P.G. des alcanes couplée à la spectrométrie de masse. Les traits verticaux indiquent l'endroit où le spectre a été enregistré..

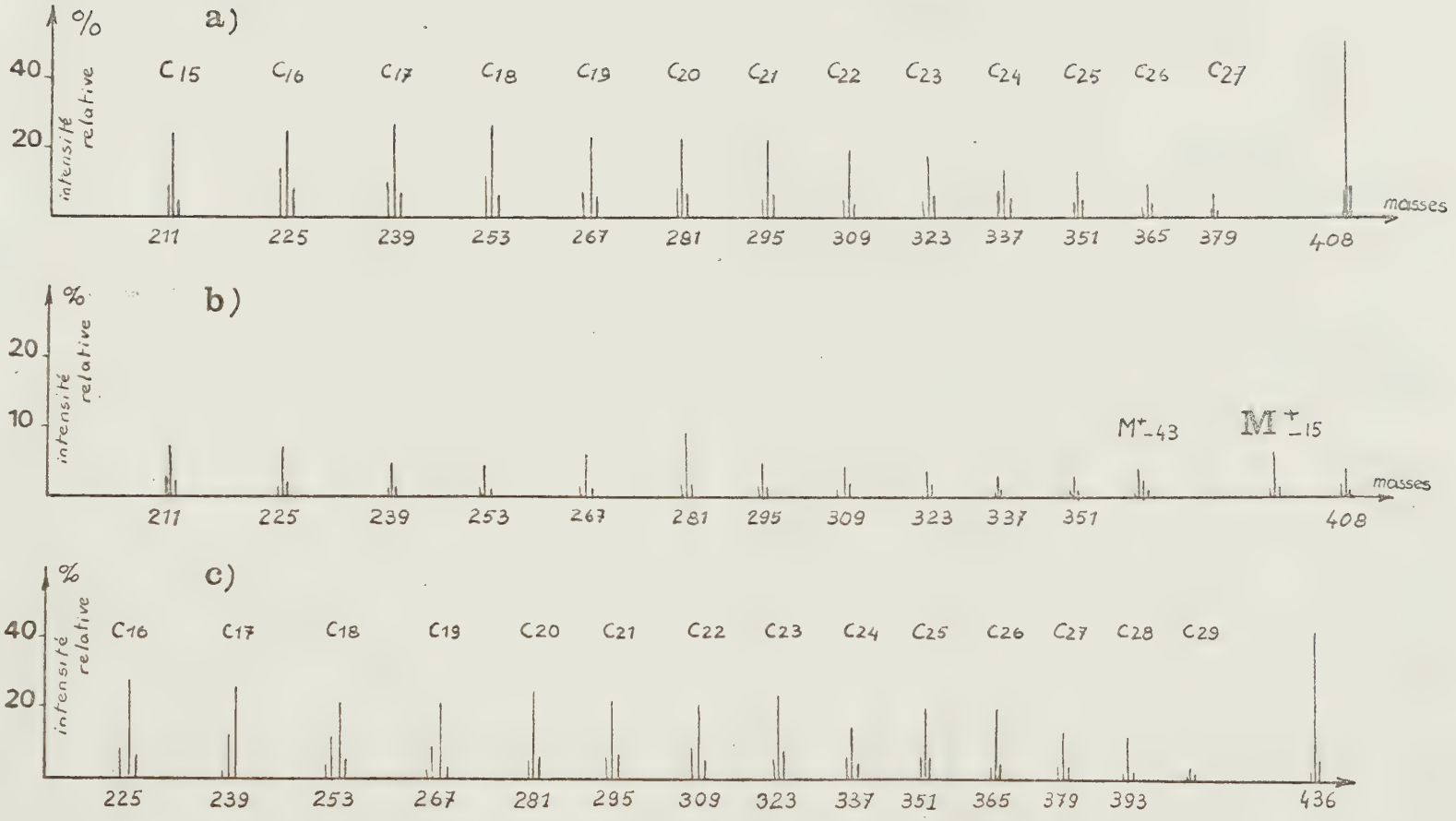


Fig. 14 - Spectres de masse des alcanes séparés par CPG.

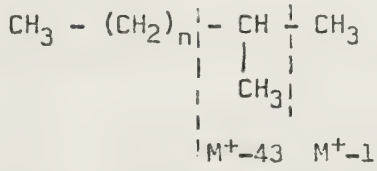
a) n-C_{29}

b) iso C_{29} + ε n-C_{29}

c) n-C_{31}

et Gülz (1968)

Les spectres des isoalcanes de C_{23} à C_{29} ont été établis. Dans la figure 14c, on a porté l'exemple de l'isononacosane. On observe une nette diminution de l'intensité relative du pic moléculaire et on voit apparaître un pic important à $M^+ - 15$ et un autre plus faible à $M^+ - 43$. La fragmentation $M^+ - 15$ et $M^+ - 43$ est caractéristique de la présence d'un groupement méthyle en position 2 :



Les calculs montrent cependant que les pics $M^+ - 15$ et $M^+ - 43$ ont une intensité inférieure à celle décrite par Beynon (1968). Cela signifie que l'hydrocarbure ramifié est souillé par une faible quantité d'alcane linéaire ; le fait important est que cette technique nous permet de mettre en évidence sans ambiguïté les alcanes ramifiés et de préciser la position de la ramification.

chapitre II

MISE EN EVIDENCE DES SITES DE BIOSYNTHESE DES HYDROCARBURES

I - INTRODUCTION

Kaneda (1968) a étudié l'effet de la lumière sur l'incorporation de l'acétate 1-^{14}C dans les feuilles excisées de Nicotiana tabacum : les lipides internes sont largement dépendants de l'éclairement. Par contre, l'incorporation dans les cires épicuticulaires n'est pas affectée par l'obscurité. Il en conclut que la synthèse des hydrocarbures, constituant majeur des cires, est indépendante de l'éclairement. Kolattukudy (1966) travaillant sur des feuilles hachées de Brassic oleracea montre que l'incorporation dans les paraffines est indépendante de la lumière, alors que la synthèse des lipides totaux (internes et superficiels) est inhibée jusqu'à 60 % à l'obscurité. Dans une autre série d'expériences, Kolattukudy (1967) vérifie sur des feuilles hachées de B. oleracea que la synthèse des paraffines est indépendante de l'éclairement et montre que le taux de radioactivité recueillie dans les acides totaux à très longue chaîne (C_{20} à C_{26}) reste constant à la lumière et à l'obscurité. Ces faits le conduisirent à imaginer un site de synthèse non couplé à la photosynthèse, et proche de la cuticule, situé dans les épidermes ; Kolattukudy (1968c) montre que l'épiderme de Senecio odoris est capable de

synthétiser des hydrocarbures et que le parenchyme n'en synthétise pratiquement pas. Il faut remarquer cependant plusieurs points : Kaneda étudie les "cires" globalement et non les acides gras et les hydrocarbures ; Kolattukudy travaille d'abord sur des feuilles hachées dont il extrait tous les lipides. Ces résultats ne peuvent être acceptés que si l'on est sûr qu'il n'y a pas d'hydrocarbures dans les lipides internes ; il n'est d'autre part pas certain que les acides gras des cires épicuticulaires ne soient pas, même indirectement, photodépendants. Enfin, le fait d'étudier les acides gras totaux, contenant ceux des épidermes et des chloroplastes ne permet pas naturellement d'induire une relation de précurseur à produits entre deux catégories de composés dont les sites et la synthèse sont peut-être différents. Il est vraisemblable qu'une relation éventuelle entre acides gras et hydrocarbures ne pourra apparaître, au contraire, que si l'on distingue soigneusement les lipides des cires épicuticulaires de ceux du parenchyme.

Pour notre part, nous avons étudié la cinétique d'incorporation de l'acétate dans les lipides superficiels (Cassagne, 1970) ; l'influence de la lumière a ensuite été envisagée. Nous avons suivi l'incorporation de l'acétate radioactif dans les épidermes et le parenchyme isolés. Enfin, nous avons cherché si la synthèse des hydrocarbures ne pouvait être due, même partiellement, à des contaminations : cette question a été résolue en utilisant des feuilles de plants cultivés en milieu stérile.

II - CINETIQUE D'INCORPORATION D'ACETATE 2-^{14}C DANS LES CIRES

Cette cinétique a été réalisée en vue de définir un temps optimum de réaction. Les résultats obtenus (Cassagne, 1970) montrent que les hydrocarbures sont très rapidement synthétisés par la feuille ; au bout d'une heure, 34 % de

l'activité des lipides superficiels se retrouvent dans les alcanes, qui ne représentent que 15 % en masse de ces lipides ; au bout de 2 h, le taux d'incorporation s'élève à 45 % et décroît ensuite en valeur relative. Cette forte incorporation est en bon accord avec les résultats obtenus par Kolattukudy (1965) pour B. oleracea. L'allure de la cinétique rappelle celle obtenue par Mazliak (1963) pour les acides gras et les alcools des cires lors d'expériences sur des fragments de pelures de pomme, mais cet auteur a montré que ces tissus ne synthétisent pratiquement pas d'alcanes à partir d'acétate.

Les expériences ultérieures ont été réalisées sur une période de 3 heures.

III - INCORPORATION D'ACETATE A LA LUMIERE ET A L'OBSCURITE

Des fragments de feuilles de 7 cm de longueur d'un plant d'A. porrum de 5 mois sont déposés dans un bécher contenant 150 µC d'acétate de sodium U-^{14}C, d'activité spécifique 95 mC/mM, dissous dans 3 ml d'eau. De la même façon, on réalise à partir du même plant une expérience de durée égale à l'obscurité. A la fin de la période d'administration, les fragments de feuilles sont abondamment lavés ; des mesures de l'activité des dernières eaux de lavage, donnent une activité de l'ordre du bruit de fond normal. Les lipides superficiels sont extraits par le chloroforme et les lipides internes sont recueillis en soxhlet au reflux du méthanol. L'activité des diverses fractions des lipides superficiels et des lipides internes a été mesurée. Les résultats sont portés dans le tableau X.

Les résultats montrent sans ambiguïté l'existence d'au moins 2 pools de synthèse des alcanes chez A. porrum.

Tableau X

INCORPORATION de L'ACETATE en FONCTION de l'ECLAIREMENT
(dpm/mg)

	Lumière	Obscurité	% inhibition
Lipides superficiels.....	167.000	101.600	40
Acides gras.....	73.700	35.200	52,5
Insaponifiable.....	125.000	117.000	7
Hydrocarbures.....	28.500	25.800	9,6
Lipides internes + non lipides...	121.000	68.500	42,5
Acides gras.....	710.000	252.000	65
Insaponifiable.....	1.672.000	850.000	50
Hydrocarbures.....	151.200	60.200	60

- Dans les lipides superficiels, on observe une inhibition très faible de la synthèse des alcanes et de l'insaponifiable en l'absence de lumière, ce qui est en accord avec les résultats de Kaneda (1968) et Kolattukudy (1966) mais la synthèse des acides gras est inhibée à 50 %. Cela n'est pas contradictoire avec les résultats de Kolattukudy qui a travaillé sur les acides gras totaux.

- Dans les lipides internes, on note deux faits importants :

- Il existe une synthèse très active des hydrocarbures, alors que Kolattukudy (1968c) a montré que cette synthèse est très peu marquée chez Senecio odoris.

- Les hydrocarbures et les différentes catégories de lipides sont à

peu près également inhibées par l'absence de lumière. Le fait que la synthèse des alcanes est sensible à la lumière est à rapprocher de la mise en évidence de ces composés dans les chloroplastes d'Antirrhinum majus (Gülz, 1968). Cependant, les lipides "internes" peuvent également contenir des lipides "liés" des épidermes en plus des lipides "libres" et "liés" du parenchyme. Nous avons donc procédé à des expériences sur des épidermes isolés.

IV - INCORPORATION D'ACETATE DANS LES EPIDERMES ISOLES

Les épidermes supérieur et inférieur d'un plant de deux mois sont prélevés mécaniquement et déposés dans un erlenmeyer contenant 100 µC d'acétate dissous dans 3 ml d'eau. La fiole est fixée à un agitateur à secousses et violemment éclairée pendant 3 heures puis les épidermes sont abondamment lavés et les lipides extraits et fractionnés. Les activités des fractions sont portées dans le tableau XI..

Tableau XI

INCORPORATION de L'ACETATE DANS les EPIDERMES ISOLES
(dpm/mg)

	Epiderme supérieur	Epiderme inférieur
Lipides superficiels totaux.....	116.700	21.700
Alcanes extraits au $CHCl_3$ ("libres").....	3.500	400
Alcanes extraits au MeOH ("liés").....	620	24

- On voit que les épidermes sont bien un site de synthèse. Mais les taux d'incorporation, bien inférieurs à ceux de la feuille entière peuvent signifier que les épidermes ont été partiellement détériorés lors du prélèvement.

- D'autre part, il existe, là encore, une fraction d'alcanes extractibles au méthanol ; ils sont vraisemblablement attachés à des restes aliphatiques par liaison hydrophobe ou interaction de Van der Waals.

Cette expérience a été renouvelée sur un plant de 6 mois, se prêtant mieux au prélèvement des épidermes, et à la préparation d'un parenchyme exempt d'épidermes : 415 mg d'épidermes inférieur et supérieur sont prélevés mécaniquement et déposés dans un bécher de 50 ml contenant 100 µC d'acétate U-^{14}C d'activité spécifique 95 mC/mM dissous dans 5 ml d'eau. L'expérience dure 2 h 30 mn en présence de lumière. De la même façon, à partir du même plant, on prépare 7,13 g de parenchyme exempt d'épidermes. On le dépose dans un bécher contenant 100 µC d'acétate U-^{14}C dissous dans 10 ml d'eau. L'expérience dure 2 h 30 mn en présence de lumière. Après lavage et séparation des fractions lipidiques, les activités incorporées ont été mesurées.

Tableau XII

INCORPORATION DE L'ACETATE dans les EPIDERMES et le PARENCHYME ISOLES

	Cpm	Cpm/mg	% incorporation dans les alcanes
Epiderme			
Lipides totaux	125.000	31.250	
Hydrocarbures	36.000	19.500	28,8
Parenchyme			
Acides gras	12.532.000	808.000	
Insaponifiables	5.292.000	271.000	
Hydrocarbures	128.680	79.500	0,7

Ces résultats confirment parfaitement ceux de l'expérience sur les feuilles entières : l'épiderme et le parenchyme sont des sites distincts de synthèse des hydrocarbures. A la différence des résultats de Kolattukudy (1968c), l'activité spécifique (seule grandeur objective de l'intensité de la biosynthèse) est supérieure dans le parenchyme. Cependant, dans ce tissu, l'activité incorporée dans les alcanes ne représente que 0,7 % de la somme acide gras et insaponifiable, alors que dans l'épiderme, elle représente 28,8 % du total des lipides. Donc si la synthèse des alcanes est due à un système autonome à définir, son étude devra être réalisée dans les lipides superficiels où l'on peut espérer que le système enzymatique sera moins masqué que dans le parenchyme.

V - INCORPORATION D'ACETATE dans les FEUILLES CULTIVEES en MILIEU STERILE

Ayant montré la présence de deux sites de synthèse chez A. porrum, dont l'un est localisé dans l'épiderme, il restait à savoir si aucune contamination extérieure ne pouvait être impliquée dans cette synthèse.

La technique utilisée est décrite par Lutz (1969). Des graines d'A. porr sont déposées dans des boîtes de Pétri, contenant une solution de Ca $(ClO)_2$ à 40g/ pendant 1 heure ; après ce temps les graines sont reprises et déposées dans des tubes à essais contenant un milieu ainsi constitué :

Eau bidistillée	900 ml
Solution de Heller	100 ml
Gélose	6 g

La solution de Heller est composée de :

K Cl	7,5 g	$CaCl_2$, 4 H_2O	0,93 g

$NaNO_3$	6,0 g	$Na\ H_2PO_4\ H_2O$	1,25 g
$Mg\ SO_4,\ 7\ H_2O$	2,5 g	Eau q.s.p.	1 litre

Après 15 jours, les jeunes plants sont repiqués dans des erlenmeyers de 1 litre contenant 250 ml d'eau, 2,75 g de gélose et 25 ml de solution de Heller. La culture est développée en salle, sous éclairage constant, à 28° C. Après 2 mois, on prélève 0,959 g de feuilles que l'on dépose dans un bécher contenant 80 µC d'acétate U-^{14}C dissous dans 3 ml d'eau. L'expérience dure 3 h sous éclairage violent. Les lipides de surface ont une activité totale de 338.000 dpm soit 130.000 dpm/mg, alors que les alcanes présentent une activité totale de 14150 dpm, soit 23.580 dpm/mg. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de l'expérience sur les feuilles entières en présence de lumière : ils montrent qu'aucune contamination n'est responsable de la synthèse des paraffines. Les épidermes sont bien le siège de synthèse des hydrocarbures superficiels

chapitre III

ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES HYDROCARBURES

Après avoir défini les sites de la synthèse des alcanes chez A. porrum, nous avons réalisé un certain nombre d'expériences en vue de préciser le mécanisme présidant à la biosynthèse des alcanes chez ce végétal. Dans ce chapitre, nous nous limiterons à la description des expériences réalisées et des résultats obtenus La biosynthèse des hydrocarbures n'a été étudiée que dans les épidermes, ou les cires épicuticulaires. En effet, si l'on postule que le mécanisme implique un système autonome synthétisant les alcanes à partir d'acides gras, il est évident que ce système sera beaucoup plus facilement discernable dans les cires où l'incorporation d'activité dans les alcanes peut atteindre 30 % du total, alors qu'elle est toujours inférieure à 1 % dans les lipides internes. Utilisant des précurseurs éventuels tels que l'acétate, le propionate, l'isobutyrate ou la valine, nous avons mesuré les activités des différentes fractions, telles qu'esters et alcanes. Puis nous avons précisé, au sein de chaque fraction, l'activité incorporée par chaque composé et défini, lorsque cela était important, l'activité spécifique de chaque composé. C'est à notre connaissance la 1° fois que le problème de la biosynthèse des alcanes est abordé de cette façon : ni Kolattukudy, ni Kaneda, ni Dittmer, n'ont défini les activités spécifiques des alcanes, comparés aux acides gras à très longue chaîne. Cette définition est cependant d'une grande importance pour la validité des conclusions ; d'autre part, nous avons soigneusement distingué

entre cires épicuticulaires et lipides internes : pour cette raison nous n'avons jamais travaillé sur des broyats de feuille, mais sur des fragments d'une longueur d'environ 7 cm, permettant l'extraction séparée des 2 catégories de lipides. Toutes les expériences décrites ont été réalisées à la lumière.

I - MATERIEL ET METHODES

a) Préparation des esters et des alcanes comme précédemment.

b) Comptage des activités globales : sur compteur à scintillation Nuclear Chicago.

c) Comptage des activités par constituant :

Nous avons utilisé 2 techniques, toutes deux faisant appel à une séparation préalable des différents composés par CPG. La détection de la CPG étant destructrice, on a installé un diviseur d'effluent envoyant 1 % du mélange vers la détection à ionisation de flamme et 99 % vers la mesure de l'activité.

La 1° technique mesure en continu les débits radioactifs dans une cellule de 10 ml après combustion des produits marqués dans un four transformant les substances organiques radioactives en $^{14}CO_2$. L'appareil utilisé est le Flow Analyzer Packard 3021. L'activité des différents composés est enregistrée parallèlement au chromatogramme analytique.

La 2° méthode de collection de fractions, permet de piéger les composés (décelés par CPG) sur des cartouches d'anthracène. L'appareil Packard 852 nous a été gracieusement prêté par les établissements Packard. Le piégeage sur cartouches remplies d'anthracène permet de mesurer directement l'activité dans un compteur à scintillation ; le rendement est légèrement abaissé, mais la

technique est beaucoup moins lourde.

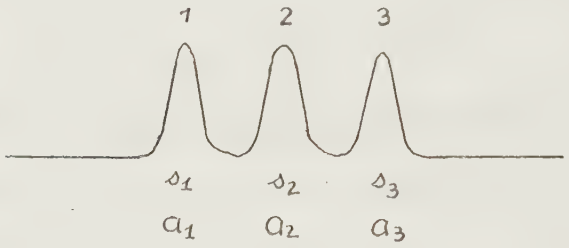
d) Mesure des activités spécifiques :

Le calcul des activités spécifiques apparentes a été réalisé de la façon suivante :

Soit : As_M l'activité spécifique du mélange envisagé, en dpm/mg

s_1, s_2, s_3 les surfaces des pics du mélange en CPG

a_1, a_2, a_3 les activités en dpm des composés 1, 2 et 3 du mélange



On définit A_T = activité totale dans la mesure = $a_1 + a_2 + a_3$ en dpm

$S = s_1 + s_2 + s_3$

$As_M = k\ A_T$

$$\text{d'où} \quad As_i = k\ \frac{a_i \times S}{s_i}$$

où As_i définit l'activité spécifique apparente du composé de rang i.

Le calcul est identique pour les 2 techniques, radiochromatographie et piégeage.

e) Conditions de CPG :

Les esters méthyliques et les alcanes ont été analysés sur colonne de SE 30 de 1/4 pouce de diamètre, de longueur 2 m, remplie à 5 % sur chromosorb W, programmation de 248° à 326° C à 6°/minute.

Débit N_2 dans la cellule : 110 ml/minute

Air 2,4
bars vitesse 0,5 inche/minute
H_2 1,4

II - INCORPORATION D'ACETATE U-^{14}C DANS les ACIDES GRAS et ALCANES des CIRES

a) 13,545 g de fragments de feuilles de 7 cm de long sont prélevés sur un plant de 5 mois et plongés dans un bécher contenant 100 µC d'acétate U-^{14}C à 95 mC/mM. L'expérience dure 15 h ; les feuilles sont alors abondamment lavées et les lipides superficiels sont extraits par le chloroforme pendant 5 minutes. Puis les lipides internes sont extraits au méthanol pendant 12 h au reflux. Les différentes fractions sont séparées et leur activité mesurée sur une partie aliquote dans un compteur à scintillation. On obtient les résultats globaux du tableau XIII.

Tableau XIII

INCORPORATION D'ACETATE dans les FRACTIONS LIPIDIQUES d'A. Porrum

	dpm	dpm/mg
Lipides superficiels.....	13.320.000	890.000
Acides gras.....	524.000	149.600
Insaponifiable.....	9.560.000	860.000
Hydrocarbures.....	710.000	182.000
Lipides internes + non lipides...	62.200.000	69.450
Acides gras.....	14.000.000	537.000
Insaponifiable.....	21.200.000	955.000

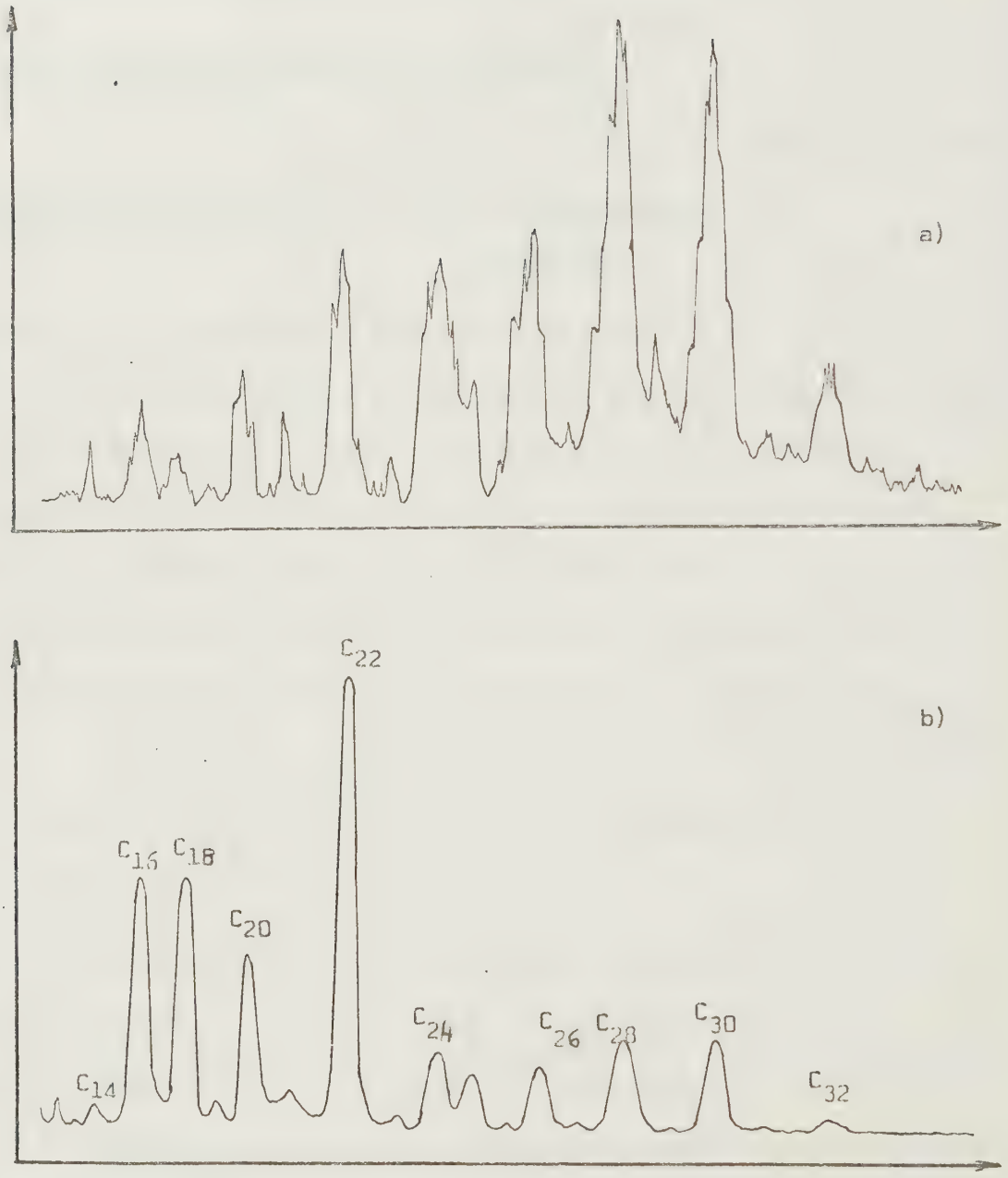


Fig. 15 - Esters méthyliques des cires marquées par l'acétate. U-^{14}C pendant 15 h.

a) pics d'activité

b) pics de masse.

On peut remarquer le % d'incorporation très élevé dans les deux catégories de lipides. L'activité spécifique des alcanes des cires est comparable à celle des acides gras de cette fraction.

b) Mesure de l'activité spécifique de chaque acide gras :

Un exemple de mesure continue des activités des acides gras est donné dans la figure 15 en comparaison avec le chromatogramme analytique. Nous avons testé la validité des 2 techniques employées en analysant le même échantillon par radiochromatographie et par le système de la collection de fractions suivie de la mesure d'activité dans un compteur à scintillation. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau XIV .

Tableau XIV

INCORPORATION D'ACETATE dans les ACIDES GRAS des CIRES

Nombre de carbone	% masse	As (dpm/mg)	% d'incorporation (Radiochromato)	% d'incorporation (collection)
non ident.	4,3	-	-	-
14	0,6	120.000	0,3	0,5
16	3,0	85.000	3,4	1,7
18	3,0	74.000	3,7	1,5
19	t	-	-	1,4
20	8,6	62.000	3,7	3,6
21	t	-	-	-
22	38,7	39.000	10,2	10,5
23	3,1	119.000	t	2,4
24	5,0	380.000	14,9	13,2
25	3,8	96.000	t	2,4
26	4,4	300.000	11,5	8,6
27	2,1	99.000	t	3,7
28	7,1	474.000	24,1	22,5
29	2,5	125.000	t	2,4
29,7 + 30	11,2	280.000	23,3	19,1
31	t	-	t	1,8
32	2,6	250.000	3,7	4,2

On voit que les résultats obtenus par les deux techniques sont tout à fait comparables ; nous avons par la suite utilisé l'une ou l'autre, réservant la collection de fractions aux échantillons les plus faiblement marqués.

Les résultats exposés appellent quelques remarques :

- Les acides gras de longueur inférieure à 20 atomes de carbone n'incorporant qu'environ 20 % du total. Les activités spécifiques apparentes sont également faibles.

- Les acides gras à très longue chaîne incorporent une part prépondérante de l'activité, essentiellement dans les acides tétra-, hexa-, octa-cosanoïques et l'acide triacontanoïque, qui renferme 20 % de l'activité totale. Hawke et Stumpf (1965) avaient déjà mis en évidence une très forte incorporation d'activité dans les acides de C_{20} à C_{26} de Lolium perenne, mais à notre connaissance, c'est la première fois que des taux d'activité aussi élevés sont signalés dans des acides de 28 à 32 atomes de carbone.

c) Mesure de l'activité spécifique de chaque hydrocarbure :

Les mesures ont été réalisées de la même façon que pour les acides gras, par radiochromatographie, puis par collection de fractions. Un exemple de radiochromatogramme des alcanes marqués à l'acétate est donné dans la figure 16. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau XV.

- On note tout d'abord une très bonne concordance entre les deux techniques permettant d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre.

- Les activités spécifiques apparentes sont très élevées dans les alcanes impairs de C_{23} à C_{31}. Les alcanes pairs sont également marqués, mais le taux d'incorporation de l'acétate dans ces composés est inférieur à 7 %

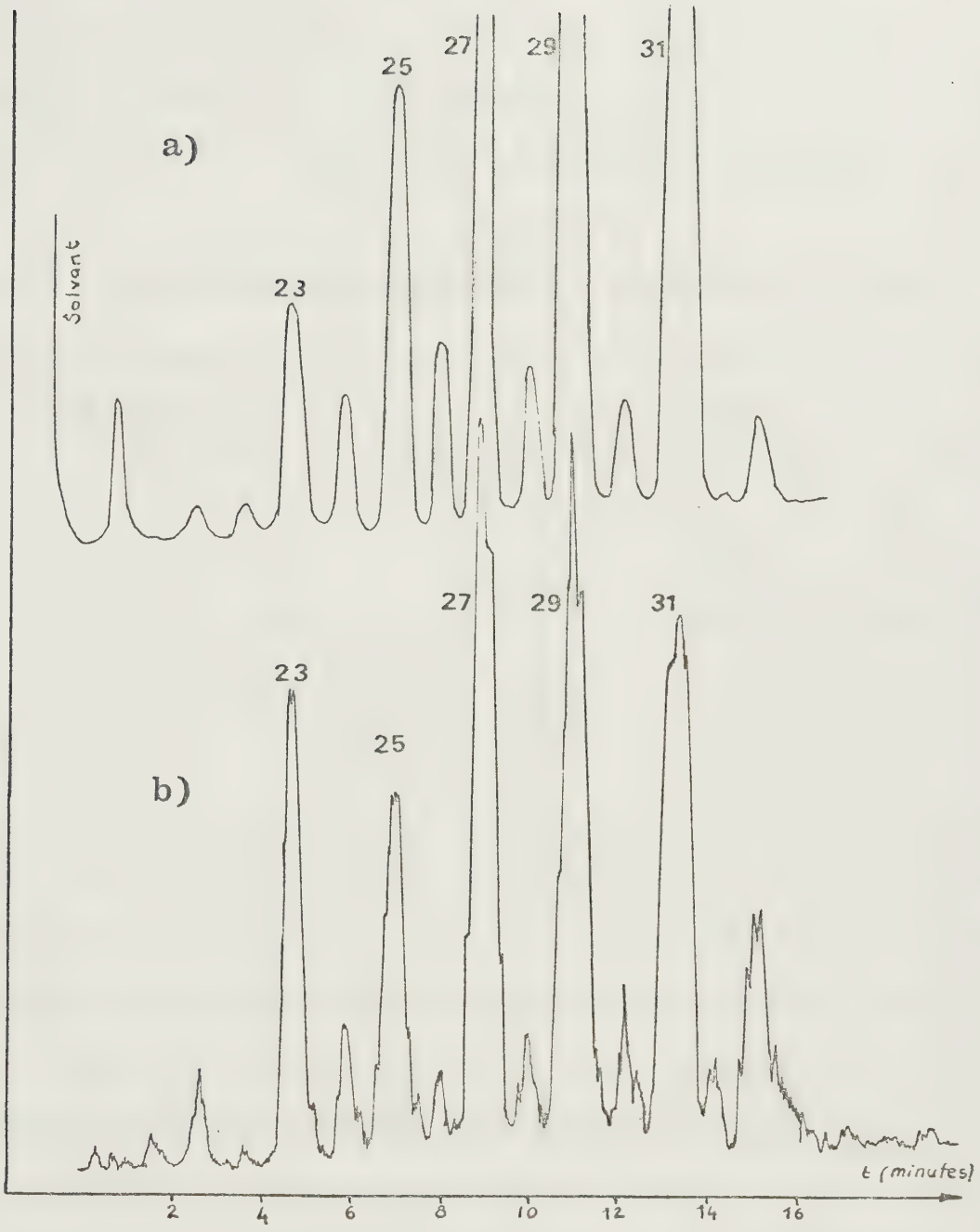


Fig. 16 - Alcanes des cires marquées par l'acétate U-^{14}C pendant 5 h.

a) pics de masse
b) pics d'activité.

- Les hydrocarbures à chaîne de longueur inférieure à C_{23} sont très peu représentés.

- Tous les alcanes impairs ont des activités spécifiques du même ordre et comparables à celles des acides gras.

Tableau XV

INCORPORATION D'ACETATE U-^{14}C dans les ALCANES des CIRES d'A. porrum

Nombre de carbone	% masse	As (dpm/mg)	% d'incorporation (Radiochromato)	% d'incorporation (collection)
15,25	4,4			
20	t	-	-	-
21	0,6	-	1,0	0,6
22	0,8	-	-	0,2
23	6,0	380.000	11,1	12,8
24	3,6	64.000	1,2	1,3
25	12,8	170.000	13,2	11,9
26	5,0	28.200	0,7	0,8
27	19,2	280.000	27,4	29,5
28	4,3	46.000	1,8	1,7
29	16,6	250.000	22,5	22,9
30	2,9	50.000	1,5	1,0
31	21,8	160.000	15,8	13,5
32		-	t	1,3
33		-	4,8	2,2

III - INCORPORATION de PROPIONATE DANS LES ACIDES GRAS ET ALCANES DES CIRE

Nous avons réalisé plusieurs expériences dont nous donnerons 2 exemples :

a) 24,080 g de fragments de feuilles de 10 cm de long sont prélevés sur un plant de 5 mois et déposés dans un bécher contenant 100 µC de propionate de sodium 3-^{14}C d'activité spécifique 5 mC/mM, dissous dans 10 ml d'eau. L'expé-

rience dure 9 h en présence de lumière. Après réaction, les feuilles sont abondamment lavées et les lipides superficiels sont extraits par le chloroforme pendant 5 minutes. Les résultats sont portés dans le tableau XVI .

Tableau XVI

INCORPORATION de PROPIONATE dans les CIRES D'A. porrum

	dpm	dpm/mg
Lipides superficiels totaux.	290.000	10.000
Acides gras.....	39.800	9.045
Insaponifiable.....	122.000	5.240
Hydrocarbures.....	8.720	1.160

Le taux d'incorporation est inférieur à celui obtenu avec l'acétate. De même, les alcanes incorporent une fraction plus faible du total de l'activité. Cette activité est trop faible pour donner de bons résultats, et les expériences ultérieures ont été réalisées sur une période beaucoup plus longue.

b) 45 g de fragments de feuille de 8 cm de longueur sont prélevés sur un plant de 7 mois et demi et déposés dans un bécher contenant 100 µC de propionate 1-^{14}C d'activité spécifique 37 mC/mM, dissous dans 5 ml d'eau. L'expérience dure 30 h à la lumière. Après 6 h et 18 h de réaction, on ajoute 5 ml d'eau. Les feuilles sont ensuite lavées et les lipides des cires sont extraits par $CHCl_3$ pendant 5 minutes. Les résultats sont portés dans le tableau XVII.

Tableau XVII

INCORPORATION du PROPIONATE dans les CIRES d'A. porrum

	dpm	dpm/mg
Lipides superficiels totaux	463.800	3.380
Acides gras.....	27.000	5.400
Insaponifiable.....	257.000	7.348
Hydrocarbures.....	89.560	4.860

L'incorporation dans les alcanes (19 % du total des lipides) est importante. D'autre part, les activités spécifiques des alcanes et des acides gras sont du même ordre et permettent l'étude du marquage des différents composés par collection de fractions.

Les activités des divers acides gras et alcanes sont regroupées dans les tableaux XVIII et XIX.

Dans ces expériences en présence de propionate, l'incorporation a été effectuée sur un plant plus âgé que lors de l'étude avec l'acétate ; la composition en alcanes a fortement varié, dans le sens indiqué au chapitre I : les alcanes les plus importants deviennent les C_{31} et C_{33}, les plus caractéristiques des cires d'A. porrum.

Comme avec l'acétate, les acides gras pairs et impairs sont tous marqués. Les acides gras de condensation inférieure à C_{20} incorporent moins de 10 % du total des acides gras, bien que leur masse intervienne pour 50 %.

Les acides C_{25}, C_{27}, C_{29} et C_{31} incorporent 55 % de l'activité totale.

Tableau XVIII

INCORPORATION de PROPIONATE 1-^{14}C dans les ACIDES GRAS des CIRES

Nombre d'atomes de carbone	% (masse)	Activité spécifique (dpm/mg)	% d'incorporation par composé
14	9,5	1.100	2,2
15	-	-	-
16	25,0	520	2,7
16,3	23,0	360	1,7
17	non dosable	-	-
18	8,0	2.600	4,3
19	non dosable	-	1,9
20	5,6	1.450	1,7
21	t	-	2,1
22	12,2	800	2,0
23			2,0
24	1,3	7.500	2,0
25	0,3	105.000	6,3
26	1,0	14.000	2,9
27	0,7	95.000	13,7
27,8 + 28	5,8	6.200	7,4
29	1,0	83.500	17,2
29,7 + 30	5,4	7.000	7,8
31	0,4	215.000	17,7
32	0,8	18.125	3,0

Tableau XIX

INCORPORATION de PROPIONATE 1-^{14}C dans les ALCANES des CIRES

Alcanes	% (masse)	Activité spécifique (dpm/mg)
C19	t	t
C20	0,9	-
C21	t	-
C22	t	-
C23	0,07	-
C24	0,06	
C25	0,6	25.400
C26	0,15	116.000
C27	0,85	29.600
C28	0,07	360.000
i C29	0,12	-
C29	2,2	28.600
C30	0,15	231.000
i C31	0,4	-
C31	28,3	3.360
C32	0,02	200.000
C33	66,1	2.360

l'acide le plus marqué est le C_{31}.

Les activités spécifiques des hydrocarbures pairs sont de l'ordre de 200.000 dpm/mg, alors que celles des alcanes impairs sont de 30.000 dpm/mg jusqu'au C_{29}, puis d'environ 3.000 dpm/mg jusqu'au C_{33}.

IV - INCORPORATION DE VALINE ET D'ISOBUTYRATE DANS LES CIRES

Cette étude a été réalisée dans le but de préciser la biosynthèse des hydrocarbures ramifiés. Le poireau est un végétal apparemment peu favorable à cette étude, si on le compare à Nicotiana tabacum. On ne rencontre que des traces de dérivés ramifiés, dont les taux représentent toujours moins de 1 % du total. Des expériences préliminaires ont été réalisées avec la valine U-^{14}C d'activité spécifique 105 mC/mM. Les incorporations sont faibles.

a) 3,125 g de fragments de feuille de 7 cm sont déposés dans un bécher contenant 50 µC de valine U-^{14}C. L'expérience dure 4 h à la lumière. Les résultats sont portés dans le tableau XX.

Tableau XX

INCORPORATION de VALINE dans les CIRES d'A. porrum

	dpm	dpm/mg
Lipides superficiels.....	61.000	21.000
Acides gras.....	6.500	6.000
Hydrocarbures.....	975	1.950

L'incorporation dans les lipides internes est encore plus faible :

Tableau XXI

INCORPORATION d'ISOBUTYRATE dans les LIPIDES d'A. porrum

	dpm	dpm/mg
Lipides superficiels.....	341.000	13.600
Acides gras.....	19.090	2.936
Insaponifiable.....	185.000	11.250
Hydrocarbures.....	47.050	22.404
Lipides internes + non lipides.....	26.528.000	40.688
Acides gras.....	647.482	22.718
Insaponifiable.....	1.315.800	131.580
Hydrocarbures.....	2.400	1.600

Tableau XXII

INCORPORATION d'ISOBUTYRATE dans les ALCANES D'A. porrum

Acides	% d'incorporation	Acides	% d'incorporation
C16 à C20	0,5	C27	1,0
C21	-	i C28 + C28	0,6
C22	-	i C29	16,5
C22:1	0,9	C29	6,4
i C23	0,6	i C30	0,3
C23	0,6	C30	1,6
C24	0,6	i C31	22,0
i C25	8,7	C31	9,9
C25	1,3	C32	2,1
i C26	-	C33	1,3
C26	1,7	C33 à	1,2
i C27	22,7	C36	

150 dpm/mg pour les alcanes. Les expériences réalisées sur une durée plus longue n'amènent guère d'augmentation des activités spécifiques : en 28 h, l'activité spécifique des alcanes est de 2.000 dpm/mg. L'essentiel de l'incorporation se trouve dans les "non-lipides" extraits par le méthanol en même temps que les lipides, par exemple les protéines des complexes lipoprotéiques.

b) Nous avons alors réalisé des expériences avec l'isobutyrate 1-^{14}C d'activité spécifique 30 mC/mM. Un contact pendant 9 h à la lumière, conduit à une incorporation de 4.950 dpm dans les alcanes, soit 3.440 dpm/mg.

c) 17,542 g de fragments de feuilles de 10 cm de longueur sont prélevés sur un plant de 5 moiset déposés dans un bécher contenant 125 µC d'isobutyrate 1-^{14}C dissous dans 5 ml d'eau. Au bout de 12 h et de 24 h, onrajoute 5 ml d'eau. L'expérience dure 48 h à la lumière, à 28° C. Les activités des différentes fractions sont portées dans le tableau XXI.

On observe une incorporation satisfaisante dans les alcanes des cires : en effet, ils incorporent 13,8 % de l'activité totale, alors qu'ils représentent seulement 8,5 % en masse.

Les lipides internes n'incorporent que très faiblement l'isobutyrate dans leurs alcanes.

d) Etude de l'activité individuelle des alcanes :

Les alcanes ont été analysés sur un appareil Packard 7401

1) Colonne de verre 9 pieds, diamètre 3 mm, à 36 % d' E.G.S.S.X., programmation 160° à 240° C à 2° C/minute.

2) Colonne 15 % OV1 programme 160° à 320° C, 4° C/minute, mêmes conditions.

En raison de leur très faible abondance, les pourcentages des dérivés ramifiés sont très difficiles à chiffrer avec précision aussi avons nous préféré calculer le pourcentage d'activité incorporée par chaque composé (tableau XXII).

e) Examen des résultats :

Comme dans les expériences précédentes les constituants à chaîne relativement courte sont très peu marqués. Le taux d'incorporation dans les alcanes ramifiés pairs est pratiquement nul, alors qu'il est très important pour les ramifiés impairs, dont l'activité spécifique est très forte compte tenu de leur faible abondance.

Les alcanes pairs et impairs à chaîne droite sont marqués, surtout les impairs, mais à des taux très inférieurs à ceux des alcanes ramifiés : l'isobutyrate est essentiellement incorporé dans les alcanes ramifiés impairs.

V - INCORPORATION D'ACETATE DANS LES FEUILLES CULTIVEES EN MILIEU STERILE

La réalisation de cette expérience a déjà été décrite au paragraphe V du chapitre II. L'analyse de l'activité au sein des alcanes a été réalisée dans les mêmes conditions que l'expérience avec l'isobutyrate. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau XXIIIet la figure 17.

Le plant utilisé avait 2 mois : les alcanes pairs représentent environ 40 % du total. Le C_{31} et le C_{33} n'interviennent que pour 20 % du total.

L'activité est incorporée à 80 % dans les alcanes impairs. On note cependant une anomalie au niveau du C_{28} qui incorpore une activité presque égale à celle du C_{29}. Les pics les plus marqués sont les C_{23}, C_{25}, C_{27} et C_{29} ; à ce stade du développement les C_{31} et C_{33} n'incorporent pratiquement pas d'activité.

Tableau XXIII

INCORPORATION d'ACETATE dans les ALCANES d'A. porrum CULTIVE en MILIEU STERILE

Nombre d'atomes de carbone	% (masse)	% activité incorporée	Activité spécifique (dpm/mg)
21	t	t	-
22	t	0,3	-
23	2,3	6,7	68.000
24	5,0	3,0	14.000
25	11,9	13,1	28.000
26	11,2	1,7	3.500
27	16,8	43,7	61.000
28	11,2	11,3 ?	20.000
29	10,6	12,1	28.000
30	7,5	2,1	6.500
31	16,2	5,0	6.000
32	3,3	0,8	5.000
34	1,0	-	-
35	0,7	-	-

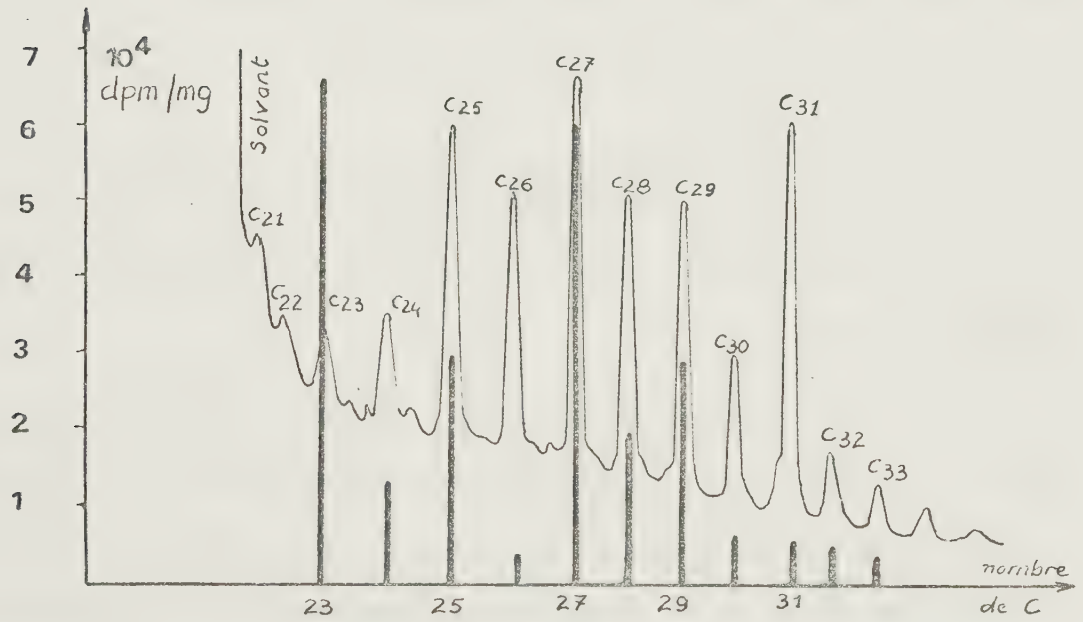


Fig. 17 - Incorporation d'acétate dans les alcanes d'A. porrum cultivé en milieu stérile.

chapitre I V

PROPOSITION D'UN MECANISME DE BIOSYNTHESE DES HYDROCARBURES

A partir des résultats des diverses expériences que nous venons d'exposer, nous avons tenté de déduire un mécanisme de biosynthèse rendant compte des phénomènes observés ; nous nous sommes limité à l'étude des alcanes des cires épicuticulaires : la synthèse des alcanes des lipides internes, vraisemblablement des chloroplastes constitue un autre problème bien particulier, dont la solution paraît délicate.

I - INCORPORATION D'ACETATE :

Des expériences réalisées en présence d'acétate, on peut faire les remarques suivantes :

1) A la différence des résultats obtenus par Kolattukudy (1967) où les acides gras à très longue chaîne incorporent au mieux 10 % de l'activité totale de cette fraction, dans le cas d'A. porrum ils en renferment 90 %. Les acides gras mis en évidence dans les cires épicuticulaires proviennent vraisemblablement des épidermes. L'examen des activités spécifiques apparentes de ces acides est intéressant : elles sont toutes de l'ordre de 300.000 dpm/mg pour les acides gras pairs de C_{24} à C_{32}. On note aussi une incorporation dans les acides gras impairs, mais

leurs activités spécifiques sont 3 à 4 fois plus faibles, ce qui correspond à un taux d'incorporation 10 fois moindre.

2) L'activité brute incorporée dans les acides de C_{14} à C_{20} est faible, mais surtout, les activités spécifiques sont très inférieures à celles des acides à très longue chaîne : 85.000 dpm/mg pour le C_{18}, 74.000 pour le C_{16}.

3) Les alcanes impairs d'A. porrum ont des activités spécifiques de 200.000 à 300.000 dpm/mg, donc comparables à celles des acides pairs à très longue chaîne, (fig. 18). Il semble, quel que soit son mode de formation, que la chaîne hydrocarbonée se constitue par addition d'unités à 2 atomes de carbone.

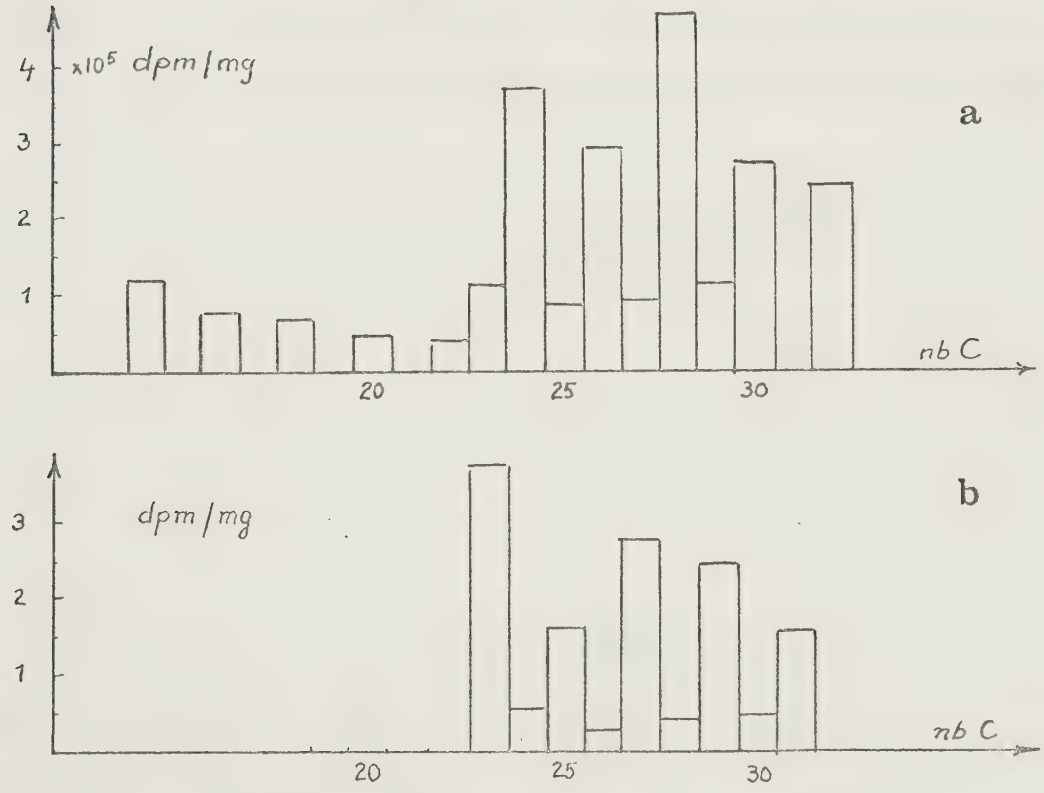


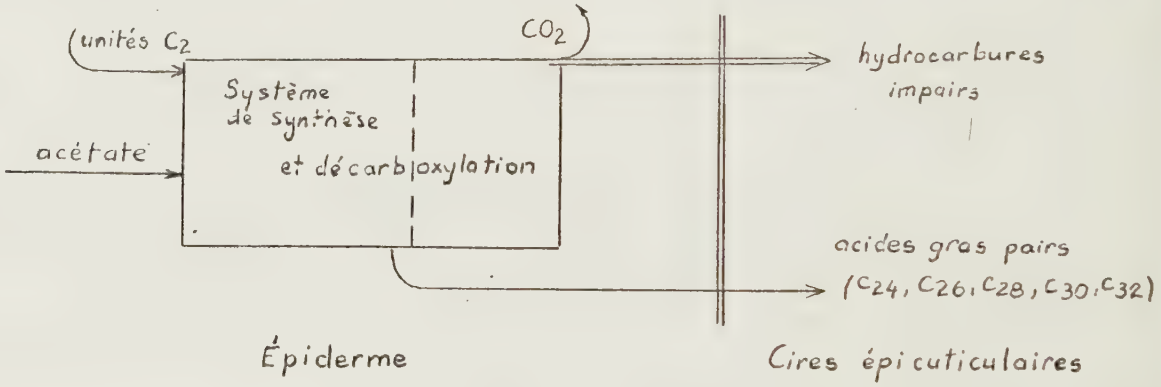
Fig. 18 - Incorporation d'acétate dans les cires épicuticulaires d'A. porrum

a) dans les acides gras

b) dans les alcanes

II - PROPOSITION D'UN MECANISME

Un mécanisme de biosynthèse du type accepteur-donneur (Kolattukudy, 1968d, 1970) paraît peu probable chez A. porrum : un tel mécanisme, utilisant essentiellement les acides C_{16} et C_{18} conduirait nécessairement à des alcanes d'activités spécifiques beaucoup moins importantes que celles observées ; l'examen des activités spécifiques des acides gras suggère fortement une synthèse "de novo" du type de celle décrite par Lynen (1962) et où chaque acide dérive du précédent par addition de chaînons à 2 atomes de carbone : les acides gras ainsi formés auraient des activités spécifiques comparables et ces acides après décarboxylation conduiraient aux alcanes de même activité : c'est ce que l'on observe. Les acides gras, à divers stades de synthèse, pourraient en partie échapper au système enzymatique avant la décarboxylation. Un schéma rendant compte des phénomènes est le suivant :



III - DISCUSSION

Ce système est localisé dans l'épiderme : en effet nous avons montré que la synthèse des alcanes des cires (à la différence de ceux des lipides internes) est indépendante de la lumière. D'autre part, nous avons vu que prélevés dans de bonnes conditions, les épidermes isolés exempts de chloroplastes sont capables de

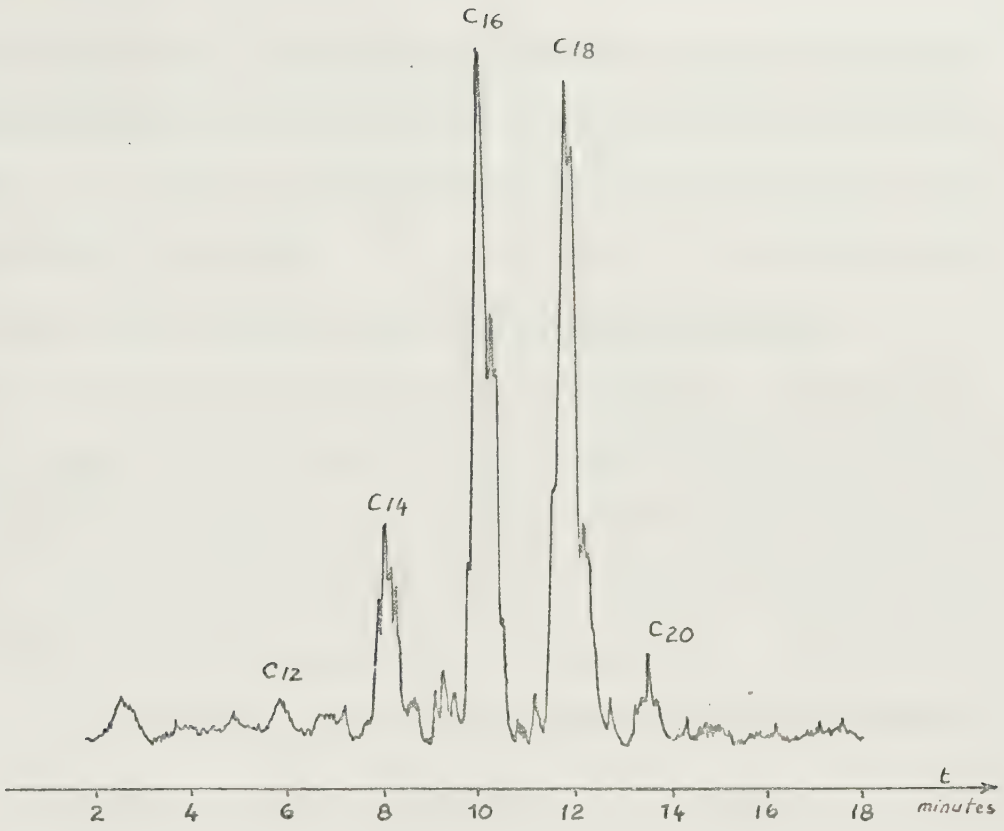


Fig. 19 - Radiochromatogramme des acides gras des lipides internes d'Allium porrum

synthétiser les alcanes à des taux très élevés : 18 % de l'activité introduite dans les cires se trouvent dans les paraffines. Ces taux sont tout à fait comparables à ceux obtenus avec la feuille entière. Un tel système est donc indépendant des chloroplastes.

Selon Kolattukudy (1967,1970) l'acide palmitique servant de substrat à l'élongation est synthétisé dans les chloroplastes, par une acide-gras-synthétase photodépendante. Cet acide est ensuite transféré dans l'épiderme où il conduit aux alcanes après élongation et décarboxylation. Cependant Kolattukudy (1968c) a étudié le marquage d'acides gras par l'acétate dans des épidermes isolés de S. odoris. Il montre que ces épidermes synthétisent essentiellement C_{16}, C_{18} et C_{20}. On observe également à l'état de traces, les acides C_{14}, C_{22}, C_{24} et C_{26}.

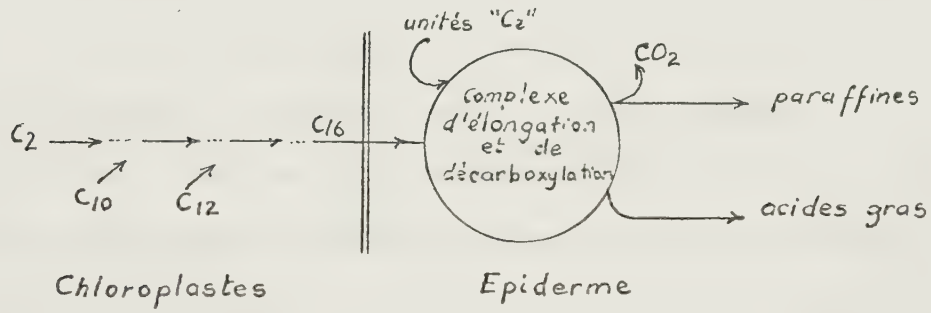
L'épiderme est donc capable de synthétiser de novo tous les acides gras nécessaires à la synthèse des alcanes. De plus, c'est dans l'épiderme qu'il retrouve tous les acides à très longue chaîne marqués, qui sont totalement absents des chloroplastes. L'étude des acides gras des lipides internes d'A. porrum confirme cette hypothèse : on n'observe d'activité que dans les acides C_{14}, C_{16} et C_{18} (figure 19). Il est possible que les activités d'acides à très longue chaîne soient trop inférieures à celles du C_{16} et du C_{18} pour être décelées.

La synthèse de novo des acides gras dans les chloroplastes appartient à un système bien distinct dont rien ne permet de penser qu'il est relié à celui de l'épiderme. Dans aucun de nos résultats il n'y a d'évidence d'une nécessité de compartimenter le système enzymatique.

Dans le système d'élongation-décarboxylation de Kolattukudy (1967, 1970) ce clivage est fondé sur les différences de comportement des acides gras totaux et

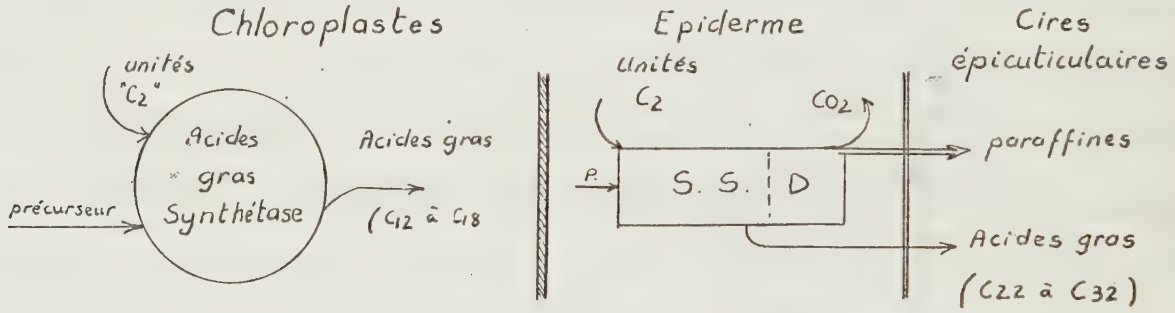
des alcanes, extraits de feuilles hachées de B. oleracea, vis à vis de réactifs tels que le trichloracétate (T.C.A.) ou la chlorophényldiméthylurée (C.M.U). Juniper (1959) a montré que l'application de T.C.A altère et diminue la couche cireuse des feuilles. Kolattukudy (1967) montre que le T.C.A. inhibe la synthèse des cires à des taux qui permettent cependant la synthèse des acides jusqu'à C_{18}. D'autre part, le C.M.U. inhibe beaucoup plus la synthèse des acides gras de C_{14} à C_{18} que celle des alcanes ; mais les taux d'incorporation dans les acides supérieurs à C_{20} restent constants. Cet ensemble de faits suggère fortement une relation entre acides gras à très longue chaîne et alcanes, mais pas obligatoirement entre acides plus légers et alcanes.

Kolattukudy a traduit ces résultats par le schéma suivant :



Ainsi les chloroplastes fournissent essentiellement du C_{16} au complexe d'élongation-décarboxylation. Cette interprétation pose le problème du transfert d'acide des chloroplastes vers l'épiderme. Les données sur cette question sont très rares. Ben Abdelkader et Mazliak (1970) ont mis en évidence sur des tissus végétaux des échanges de lipides marqués du surnageant cytoplasmique vers les mitochondries ou les microsomes de pomme de terre. Ces expériences sont réalisées in vitro, après destruction de l'architecture des cellules, ce qui peut favoriser les échanges. Mais il est possible que ces échanges aient lieu également in vivo.

Cependant, il n'y a pour la synthèse des alcanes aucune évidence d'un transfert de lipides des chloroplastes vers les épidermes. Une explication plausible des faits observés par Kolattukudy est envisageable en faisant intervenir le mécanisme que nous proposons : on observerait alors la superposition de deux mécanismes distincts due au fait que Kolattukudy étudie les acides gras totaux et alcanes totaux.

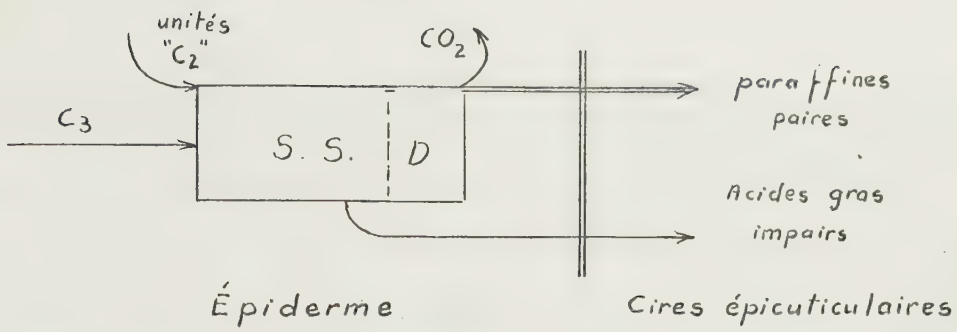


A B

En effet, le T.C.A. inhiberait essentiellement le système B de synthèse des alcanes, mais pas le système A, par exemple parce que le T.C.A. ne peut pénétrer dans les chloroplastes. On aurait alors essentiellement production d'acides gras à courte chaîne (C_{14} à C_{18}). C'est ce que l'on observe. Le C.M.U. inhibant presque totalement le système A, on n'observerait que les acides gras à longue et très longue chaîne et les alcanes. C'est encore ce qui est observé.

IV - INCORPORATION DE PROPIONATE

Si l'hypothèse proposée pour la biosynthèse des alcanes chez A. porrum est correcte, l'emploi d'un précurseur tel que le propionate ^{14}C doit conduire à une synthèse intense d'acides impairs à très longue chaîne et une synthèse des alcanes pairs selon le schéma :



Il est également nécessaire que les acides gras à chaîne de 14 à 20 atomes de carbone soient peu marqués pour éliminer la possibilité d'une condensation. C'est bien ce que l'on observe. Les acides gras impairs bien que peu abondants en masse renferment près de 70 % de l'activité totale et environ 50 % de ce total se trouvent dans les acides C_{27}, C_{29} et C_{31}, dont les activités spécifiques sont très élevées. De même, les alcanes pairs ont une activité de 200.000 à 300.000 dpm/mg, alors que celle des alcanes impairs est 10 fois moindre. Il en est de même pour les acides gras impairs. Les acides gras jusqu'à 20 atomes de carbone, n'incorporent que 10 % environ de l'activité et les activités spécifiques sont extrêmement faibles, ce qui exclut une possibilité de synthèse par condensation.

L'examen comparatif des activités spécifiques des alcanes et acides gras marqués par le propionate est donc fortement en faveur du mécanisme proposé.

V - INCORPORATION D'ISOBUTYRATE

Nous avons vu précédemment que les alcanes d'A. porrum renferment un taux très faible de dérivés ramifiés. On peut se demander si ce faible taux provient d'une spécificité du système enzymatique lui-même vis à vis des ramifiés, ou d'un faible approvisionnement de ce système en ces composés. Dans le cas d'une spécificité à l'encontre des ramifiés, l'apport d'un précurseur tel que l'isobutyrate se tra-

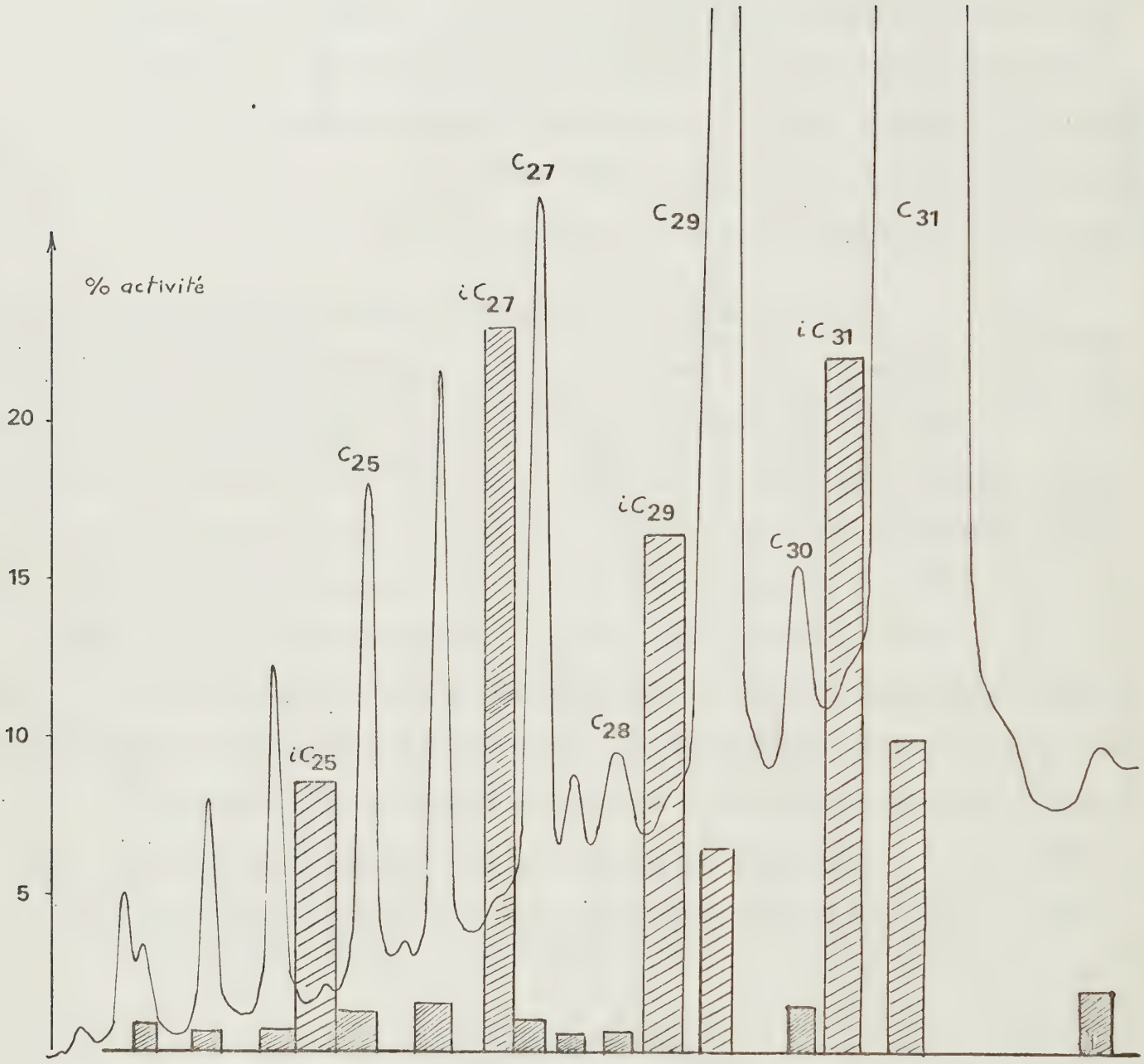


Fig. 20 - Taux d'activité incorporée dans les hydrocarbures marqués par l'isobutyrat
(en % de l'activité totale des hydrocarbures).

duirait par une très faible incorporation dans les alcanes, et dans le second cas, on aurait une incorporation comparable à celles obtenues avec des précurseurs à chaîne droite. Les premiers essais effectués avec la valine montrent une faible incorporation dans les alcanes. Il est possible que la valine soit préférentiellement incorporée dans les protéines d'A. porrum. Cependant, la valine est bien incorporée dans les alcanes de Nicotiana tabacum (Kolattukudy, 1968c) à des taux de l'ordre de 2 % des lipides. Kaneda (1967) administre à des feuilles de tabac des aminoacides ramifiés. Le marquage le plus faible est obtenu avec la valine ; il est environ 25 fois inférieur à celui obtenu avec l'acétate. Dans A. porrum, l'isobutyrate est un bon précurseur des alcanes : 14 % de l'activité des lipides se trouvent dans cette fraction. Cette incorporation est du même ordre que celle obtenue avec l'acétate ou le propionate. Les alcanes marqués sont essentiellement les alcanes iso C_{25}, iso C_{27}, iso C_{29} et iso C_{31} (figure 20). Les activités spécifiques des alcanes ramifiés n'ont pu être calculées en raison de la très faible concentration en ces composés, mais elle est très élevée car 73 % de l'activité des alcanes se trouvent dans une fraction dont la masse n'atteint pas 1 % du total. Les alcanes à chaîne droite impairs incorporent 20 % et les pairs 7 %. Ces résultats sont en bon accord avec le schéma proposé.

VI - EXCRETION DES CIRES

L'expérience d'incorporation d'acétate sur un plant de poireau cultivé en milieu stérile nous a montré qu'aucune contamination superficielle n'est responsable de la synthèse des alcanes : la synthèse a bien lieu dans les épidermes. Selon Kolattukudy (1966) les acides gras à très longue chaîne ne sont pas contenus dans les cires, à la différence des alcanes ; dans une autre série d'expériences

(1967), il montre que tous les acides gras à très longue chaîne sont liés aux phospholipides. Par contre dans A. porrum nous observons que ces acides gras se retrouvent dans les cires épicuticulaires : on peut penser que les acides gras relâchés du système enzymatique avant la décarboxylation sont excrétés dans les cires avec les alcanes et ne sont plus dès lors réactionnels, c'est-à-dire utilisables par le système enzymatique. Il est ainsi possible de les observer dans un état figé et de les comparer aux alcanes quant à leurs activités spécifiques.

L'excrétion des cires est un problème encore mal connu. Hall et Donaldson (1962) utilisant la microscopie électronique, ont mis en évidence des pores dans la cutine, par lesquels les produits formés dans l'épiderme pourraient être exsudés vers les cires épicuticulaires. Schieferstein et Loomis (1956, 1959) pensent qu'en l'absence des pores, les produits seraient exsudés à travers la cutine de la jeune feuille. Cependant, quel que soit l'âge du plant utilisé, on observe une bonne incorporation dans les cires d'A. porrum, ce qui laisse supposer qu'il est possible d'éliminer en permanence du système enzymatique de l'épiderme les produits qu'il a formés.

*

Il reste cependant un certain nombre de faits dont l'explication est actuellement difficile quel que soit le mécanisme envisagé.

1) Kaneda (1968) montre que le n-octanœte est incorporé dans les alcanes ramifiés des feuilles de tabac. Pour expliquer ce phénomène il propose donc un mécanisme de condensation. Cette hypothèse, selon Eglinton et Hamilton (1967) serait fortement invalidée si les produits marqués incorporés étaient dégradés et leurs produits réutilisés par le système enzymatique, en raison par exemple d'une durée

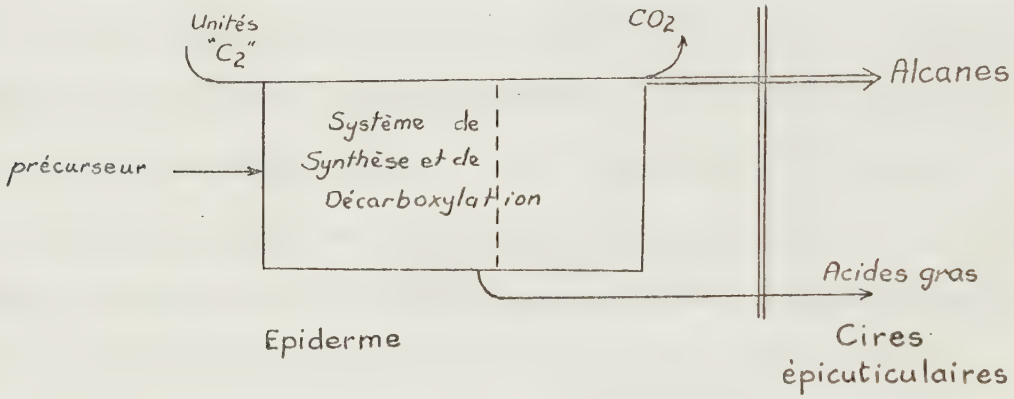
de réaction trop longue. Selon Hawke et Stumpf (1965) Macey et Stumpf (1968), l'acétate provenant de la dégradation des acides gras n'est pas directement réutilisé dans le système de synthèse des acides gras, mais, d'après Kolattukudy (1970) il pourrait être utilisé dans la synthèse des aminoacides ramifiés dont on sait qu'ils sont incorporés dans les alcanes ramifiés.

De même dans tous les résultats que nous avons obtenus, on observe des faits explicables uniquement par la dégradation des produits formés et leur réutilisation. Ainsi l'administration d'acétate conduit essentiellement aux acides gras pairs et aux alcanes impairs, mais on observe cependant environ 10 % d'acides gras impairs et 16 % d'alcanes pairs ; ce phénomène, plus ou moins marqué, se retrouve dans toutes nos expériences et implique une dégradation partielle des produits formés. Cela est d'autant plus plausible qu'afin d'obtenir des marquages intenses, les périodes d'administration sont volontairement assez longues (de 15 h à 48 h).

Une autre question encore en suspens et mal connue, est l'influence de la lumière. On a montré que la production d'alcanes dans les cires est à peu près indépendante de la lumière, alors que celle des acides gras y est sensible. Juniper (1956) a montré que la surface des plants étiolés de pois ne présente pas la formation de cires, mais après transfert à la lumière pendant 24 h, ces plants sont recouverts d'une mince couche cireuse : il est possible que la lumière développe ou stimule indirectement la synthèse des cires ; Kolattukudy (1970) a indiqué que l'incorporation d'acétate dans les alcanes est stimulée de 100 % quand on transfère des plants de pois d'un éclairage moyen (300 ft. C) à un éclairage 3 fois plus intense.

CONCLUSIONS

Les épidermes des plants d'A. porrum contiennent un système très favorable à l'étude du mécanisme de biosynthèse des alcanes dans les cires. On incorpore à des taux importants les précurseurs tels que l'acétate, le propionate et l'isobutyrate de sodium, bien que les taux en alcanes à chaîne droite ou ramifiée soient très différents. L'étude sur un seul végétal permet de relier entre elles les diverses expériences et assure une plus grande validité au mécanisme proposé pour A. porrum. Pour les alcanes superficiels la synthèse peut se faire selon le schéma suivant :



Pour nous, la synthèse a lieu dans un complexe enzymatique particulier, localisé dans les épidermes, indépendant de celui des chloroplastes. Lorsque l'acide synthétisé atteint une longueur de chaîne assez grande, il peut être relâché du complexe avant la décarboxylation ; il quitte l'enzyme et est excrété vers les cires ; il n'est plus alors réactionnel et ne peut plus être pris en charge par le système enzymatique, donc conduire aux alcanes. Cela explique que l'activité des acides gras excrétés dans la cire ne diminue pas, et permet une étude comparative des activités des acides gras et des hydrocarbures. Les activités spécifiques

des acides gras ayant de 14 à 20 atomes de carbone sont faibles et rendent fort improbable un mécanisme de condensation du type accepteur-donneur dans ce végétal.

Les alcanes sont très rapidement synthétisés : en 3 h,45 % de l'activité incorporée dans les lipides des cires se trouvent dans les alcanes. La décarboxylation, dans le complexe enzymatique, des acides gras à très longue chaîne, conduit aux alcanes qui à leur tour quittent l'épiderme et sont excrétés dans les cires. On observe ainsi, dans un milieu qui ne les synthétise pas le stockage des alcanes provenant de la décarboxylation des acides gras.

Il reste de nombreux problèmes à résoudre, concernant les alcanes des cires ; la question des alcanes des lipides internes sensibles à la lumière, est très loin d'être élucidée. Il semble que les progrès dans la connaissance des différents mécanismes qui régissent la synthèse des hydrocarbures soient maintenant tributaires de l'isolement des systèmes enzymatiques spécifiques de cette synthèse.

TROISIÈME PARTIE

INTRODUCTION

Les levures sont des organismes unicellulaires de formes variées et dépourvues de chlorophylle ; le cytoplasme est entouré d'une membrane lipoprotéique et d'une paroi essentiellement constituée de glycanes associés à des protéines dans laquelle la fraction lipidique est pondéralement peu importante.

Depuis les travaux de A. Maurice (1967) la composition en acides gras est bien connue ; Demassieux (1969) a étudié la formation d'acides gras ramifiés à partir de précurseurs possibles tels que l'isobutyrate de sodium ou la valine. Les alcanes ont été mis en évidence dans les levures (Baraud et al., 1967). Comme chez les végétaux supérieurs on trouve des hydrocarbures extractibles à l'éther, mais là encore une fraction importante n'est libérée que par le méthanol (Fabre, 1969). Cela implique pour les hydrocarbures une association qui reste à définir avec les lipoprotéines. Skipski et al. (1967) ont mis en évidence des alcanes dans les lipoprotéines de sérum humain. Albro et Dittmer (1969a) ont également pressenti ce fait en étudiant les hydrocarbures de Sarcina lutea. L'ubiquité du phénomène laisse à penser qu'il s'agit là d'hydrocarbures constitutifs jouant un rôle dans la cellule elle-même, aussi nous a-t-il paru intéressant d'entreprendre l'étude dans un organisme unicellulaire comme la levure.

Dans un premier temps, nous avons étudié la composition en hydrocarbures "libres" (extractibles à l'éther) et "liés" (extractibles au méthanol) de Schizosaccharomyces liquefaciens : on note des différences importantes dans ces deux catégories. Des essais d'incorporation de métabolites tels que la valine, l'isobu-

tyrate ou la leucine ont été réalisés.

On pouvait se demander aussi quelle était la répartition des hydrocarbures dans les différentes parties de la cellule. On peut penser en effet que les lipoprotéines sont issues des membranes (Rouser et al., 1969). Le fait, par conséquent que des alcanes soient extraits avec la fraction des protéolipides donne à penser qu'ils sont peut-être localisés dans la membrane. La cellule de levure a été fractionnée en 3 parts selon la technique de Sutton et Lampen (1962) développée par Longley, Rose et Knights (1968). On peut ainsi étudier séparément les hydrocarbures des parois cellulaires, des membranes protoplastiques et du contenu cellulaire.

Enfin, nous avons cherché à mettre en évidence l'incorporation d'acétate U-^{14}C dans les diverses fractions de la cellule : cette dernière a été réalisée sur S. cerevisiae.

chapitre I

ETUDE DES HYDROCARBURES DE LA LEVURE

La souche étudiée, Schizosaccharomyces liquefaciens CBS 1042, nous a été fournie par la Station Oenologique de Bordeaux, que nous tenons à remercier. On sait que ses taux en hydrocarbures sont peu élevés (M. Fabre, 1969), nous l'avons cependant choisie en raison de sa bonne incorporation de précurseurs tels que l'isobutyrate, la valine et la leucine dans les acides gras (Demassieux, 1969).

I - MATERIEL ET METHODES

a) Milieu de culture :

Sauf cas particuliers signalés au cours de l'étude, les levures sont mises en culture selon la technique préconisée par S. Domercq (1956), sur un milieu synthétique contenant par litre :

- 150 g de glucose
- 2 g d'asparagine
- 1 g de phosphate acide de potassium
- 5 g de sulfate d'ammonium

Puis on ajoute 1 ml de la solution d'éléments minéraux suivante, contenant par litre :

- 200 g $MgSO_4$, 7 H_2O

- 10 g $MnSO_4$, H_2O
- 2 g $FeCl_3$, 6 H_2O
- 10 g NaCl
- 250 mg $CuSO_4$
- 1,5 g $ZnSO_4$
- 125 mg $(NH_4)_2$ Mo O_4

Le pH est ajusté à 3,8 ; le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à 115° C. Après refroidissement aseptique on ajoute 1 ml de la solution de vitamines contenant par litre :

- 1 g de thiamine (B_1)
- 1 g de riboflavine (B_2)
- 1 g de pyridoxal (B_6)
- 1 g d'acide paraaminobenzoïque
- 1 g de nicotinamide
- 1 g d'acide pantothénique
- 80 mg de biotine
- 5 g d'inositol

Les levures sont ensemencées et la culture est conduite à 25° C dans une enceinte thermostatée pendant 48 h en aérobiose (débit d'air comprimé : 0,7 l/minute) ; l'aérobiose inhibe en effet totalement la formation de squalène (Baraud, Cassagne, Genevois, Joneau, 1967). La levure est recueillie par centrifugation et séchée sous vide partiel.

b) Extraction des lipides :

Une quantité de levures de l'ordre de quelques grammes est finement broyée et soumise à l'extraction en soxhlet au reflux de l'éther éthylique

pendant 48 h. On obtient ainsi la fraction des lipides dits "libres". Puis la levure débarrassée des lipides "libres" est traitée par le méthanol en soxhlet pendant 12 h. Les solvants sont évaporés et les lipides pesés. Cette technique d'extraction n'est utilisée que pour l'étude des alcanes et acides gras totaux.

c) Etude des hydrocarbures :

Les lipides "libres" et "liés" sont saponifiés ; l'insaponifiable est extrait, lavé, et le solvant est évaporé à sec ; les hydrocarbures sont séparés du reste de l'insaponifiable par passage sur colonne d'alumine éluée par l'hexane. Les alcanes sont ensuite analysés comme précédemment par chromatographie en phase gazeuse sur colonnes de D.E.G.S., Apiezon L et UCC 982. L'identification est réalisée par comparaison des temps de rétention à ceux de carbures de référence, après calcul du pic de l'air. Les pourcentages des différents alcanes ont été évalués par triangulation.

II - MISE EN EVIDENCE D'ALCANES EXTRACTIBLES AU METHANOL

A partir des levures sèches de Schizosaccharomyces liquefaciens cultivées en aérobiose pendant 5 jours, nous avons procédé à plusieurs essais d'extraction de lipides, pour préciser le taux d'hydrocarbures extractibles uniquement par le méthanol.

1) Extraction à l'éther pendant 48 h ; après 48 h le solvant est éliminé et l'on procède à une nouvelle extraction à l'éther pendant 12 h. Les alcanes de ces fractions de lipides sont extraits et pesés : on ne note pas de présence d'alcanes dans la 2° extraction à l'éther : donc au bout de 48 h l'extraction des alcanes "libres" est totale. Le taux moyen des hydrocarbures extraits par l'éther est

de 0,040 % de la levure sèche.

2) Les levures précédemment extraites à l'éther éthylique sont traitées par le méthanol bouillant en soxhlet pendant 12 h. On extrait une nouvelle quantité de lipides dont on sépare les hydrocarbures comme précédemment. Le total des hydrocarbures obtenus par ces deux extractions conduit à un taux global de 0,105 %.

3) Si l'on extrait les lipides des levures directement au méthanol, on obtient une quantité d'alcanes qui est la quantité totale d'hydrocarbures extractibles. On a ainsi obtenu des taux d'hydrocarbures par rapport à la levure sèche de 0,107 % et 0,104 %.

III - ETUDE DE L'INCORPORATION DE MOLECULES MARQUEES DANS LES HYDROCARBURES DE *Schizosaccharomyces liquefaciens*

a) Dans le milieu de culture préparé comme précédemment, on introduit en plus des constituants habituels les composés marqués pouvant jouer le rôle de précurseurs des dérivés ramifiés.

La durée d'expérimentation a été réduite à 48 h, ce qui a pour conséquence de limiter fortement la quantité d'hydrocarbures synthétisés. Les expériences suivantes ont été réalisées.

A - Culture en présence de L leucine U-^{14}C

- activité spécifique 110 mC/mM 100 µC + leucine non marquée 60 mM/

- 48 h, aérobiose.

B - Culture en présence d'isobutyrate de sodium 1-^{14}C

- activité spécifique 30 mC/mM ; 250 µC

- 48 h, aérobiose

C - Culture en présence de L valine U-^{14}C

- activité spécifique 105 mC/mM ; 50 µC

- 48 h, aérobiose

D - Culture témoin

- 48 h, aérobiose.

Les levures sont ensuite centrifugées, longuement lavées et les lipides en sont extraits d'abord à l'éther éthylique pendant 48 h, puis au méthanol pendant 24 h. Les hydrocarbures sont extraits de l'insaponifiable par chromatographie sur colonne d'alumine et pesés. Les taux en hydrocarbures sont portés dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV

TAUX en HYDROCARBURES de Schizosaccharomyces liquefaciens
(en mg pour 100 g)

	Hydrocarbures "libres"	Hydrocarbures "liés"	Total
A	27	35	62
B	17	48	65
C	13,5	27	40,5
D	22	44	66

Ces taux présentent entre eux des fluctuations : le temps de culture choisi est tel que la croissance des levures est arrêtée en phase exponentielle et il n'est pas certain que le développement des levures soit le même dans les

quatre expériences. Néanmoins les résultats sont assez voisins et l'on voit nettement que les hydrocarbures "liés" sont environ deux fois plus abondants que les hydrocarbures"libres".

b) Mesure des activités :

L'activité des acides gras et des hydrocarbures des fractions "libre" et "liée" a été mesurée sur une partie aliquote dans un compteur à scintillation. Les échantillons sont déposés dans des flacons contenant une solution dans le toluène de 2,5 diphényloxazole (PPO) et de 1,4-di- 2 (5 phényloxazolyl) benzène. Les activités enregistrées sont portées dans le tableau XXV .

Tableau XXV

ACTIVITE des ACIDES GRAS et HYDROCARBURES de Schizosaccharomyces liquefaciens (dpm/mg)

	Acides gras "libres"	Hydrocarbures "libres"	Acides gras "liés"	Hydrocarbures "liés"
A	1.428	174	4.878	550
B	1.346	220	7.038	455
C	308	515	317	660

Quel que soit le précurseur employé, les activités spécifiques sont toujours très faibles : cela interdit toute mesure par radiochromatographie. Ces taux sont cependant tout à fait comparables à ceux obtenus par M. Fabre (1969) par culture de Saccharomyces cerevisiae en présence de glucose U-^{14}C. Il est possible que la grande dilution du milieu radioactif soit responsable de cette faible incorporation, très inférieure à celle obtenue par exemple lors des expériences

sur A. porrum. On peut néanmoins remarquer que dans tous les cas les hydrocarbures "liés" sont plus marqués que les hydrocarbures "libres".

Il est probable que les hydrocarbures se forment à un niveau lipoprotéique et passent ensuite dans les lipides libres. Des résultats obtenus par M. Fabre (1969) confirment cette vue : l'activité des hydrocarbures "libres" n'atteint son maximum qu'au bout de 15 jours alors qu'en 2 jours celle des hydrocarbures "liés" est déjà de 90 % de son maximum.

c) Etude chromatographique des hydrocarbures :

Les hydrocarbures des fractions "libre" et "liée" ont été analysés par CPG dans les conditions déjà décrites, sur colonnes de D.E.G.S. et d'UCC 982. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau XXVI. Il suscite quelques remarques :

- On peut tout d'abord noter l'absence totale de squalène : la culture en aérobiose inhibe en effet totalement sa formation, ou stimule considérablement son métabolisme en d'autres composés.

- Pour les alcanes libres, on note une bonne concordance des compositions en hydrocarbures des expériences B, C et D ; le maximum se situe autour du C_{25} et tous les hydrocarbures pairs ou impairs sont à peu près également représentés Les alcanes sont absents et les isoalcanes sont présents mais en faible quantité. L'expérience A qui s'est déroulée en présence de 60 mM/l de leucine non marquée présente un aspect différent : le maximum se situe au niveau des C_{27} à C_{29}, et le C_{28} représente 14,4 % alors qu'il ne représente que de 6 à 8 % dans les expériences B, C et D.

Tableau XXVI

COMPOSITION en HYDROCARBURES de Schizosaccharomyces liquefaciens
(en % des hydrocarbures totaux)

Hydrocarbures	Expérience A (Leucine)		Expérience B (Isobutyrate)		Expérience C (Valine)		Expérience D (Témoin)	
	"Libres"	"Liés"	"Libres"	"Liés"	"Libres"	"Liés"	"Libres"	"Liés"
Alcanes								
C16	t	t	t	0,7	t	-	-	-
C17	t	t	t	1,2	t	t	0,1	-
C18	t	1,5	0,3	2,7	1,2	2,3	0,4	0,3
C19	0,2	2,9	0,7	1,4	0,9	2,9	0,7	0,9
C20	1,1	1,0	t	3,7	t	2,3	t	t
C21	1,4	4,1	1,2	5,6	1,6	2,2	1,8	0,5
C22	2,2	2,5	4,6	3,7	5,7	3,7	8,1	0,5
C23	10,8	4,9	10,4	5,5	11,4	4,3	10,0	0,9
C24	3,6	5,2	15,3	8,4	17,3	11,0	15,0	2,1
C25	4,4	2,0	17,5	7,0	14,8	9,4	17,8	2,9
C26	7,5	5,2	12,3	9,2	10,5	9,4	10,5	7,4
C27	12,7	4,7	9,4	8,6	8,3	8,7	9,1	9,4
C28	14,4	4,5	6,5	5,0	5,0	6,1	8,3	15,8
C29	12,6	4,1	4,5	5,7	4,0	6,0	6,2	12,3
C30	11,8	3,2	3,1	t	3,5	2,2	3,4	13,9
C31	9,1	1,6	3,7	t	2,5	3,9	2,5	7,5
C32	7,3	2,2	1,3	t	t	t	-	6,6
C33	-	2,3	-	-	-	-	-	2,9
Isoalcanes								
C22	0,2	-	-	0,9	-	-	t	-
C23	0,7	X3,3	0,2	0,6	0,2	0,4	0,3	-
C24	-	-	-	0,1	-	-	0,2	-
C25	-	0,2	0,1	t	t	t	0,1	-
C26	-	-	0,5	t	t	-	0,7	-
C27	-	1,5	0,9	t	0,8	0,2	1,0	-
C28	-	X18,2	1,5	0,3	t	-	0,8	-
C29	-	0,3	0,9	0,2	0,4	0,4	0,7	-
C30	-	1,4	0,5	-	-	0,5	-	-
Alcènes								
C24	-	2,3	-	-	-	-	-	-
C25	-	0,6	-	0,8	-	-	t	-
C26	-	-	-	1,1	-	-	-	-
Iso C16:3	t	18,3	4,6	21,5	6,9	23,0	2,3	15,4

- Pour les hydrocarbures liés on note une très bonne concordance entre les expériences B et C. Dans le témoin, les maxima se trouvent vers des chaînes plus longues. Dans l'expérience A on note au niveau des hydrocarbures ramifiés l'apparition de 2 pics importants X et Y au niveau respectivement de l'iso C_{23} (5,2 %) et de l'iso C_{28} (8,2 %) ; ces composés n'ont pas été identifiés avec précision.

- Enfin, dans tous les cas, on observe à des % élevés dans les hydrocarbures liés, la présence d'un composé dont le nombre de carbone est 15,25 sur UCC 982 à 270° C et 19,5 à 20,5 selon les températures sur D.E.G.S. Ce comportement sur colonnes polaire et apolaire indique que ce composé est vraisemblablement insaturé.

d) Etude du composé de nombre de carbones 15,25 :

Cette étude a été effectuée par CPG couplée à la spectrométrie de masse, dans les conditions déjà signalées à la 2ème partie: chromatographe Pye couplé à un MS 12.

Colonne 10 % UCC 982 W sur chromosorb W

Gaz porteur : Helium 25 ml/minute

Température du four 250° C

Température du séparateur 250° C.

Ces spectres de masse ont été réalisés à 70 eV. Le spectre obtenu est porté dans la figure 21. Le pic moléculaire est à 220 et correspond à la formule $C_{16}H_{28}$; ce composé est un hexadécatriène. Le pic de masse est peu intense. A M^+-15 on observe un pic important de fragmentation ; à M^+-43, on note un pic moins intense ; cette fragmentation est caractéristique d'un dérivé méthylé en 2 :

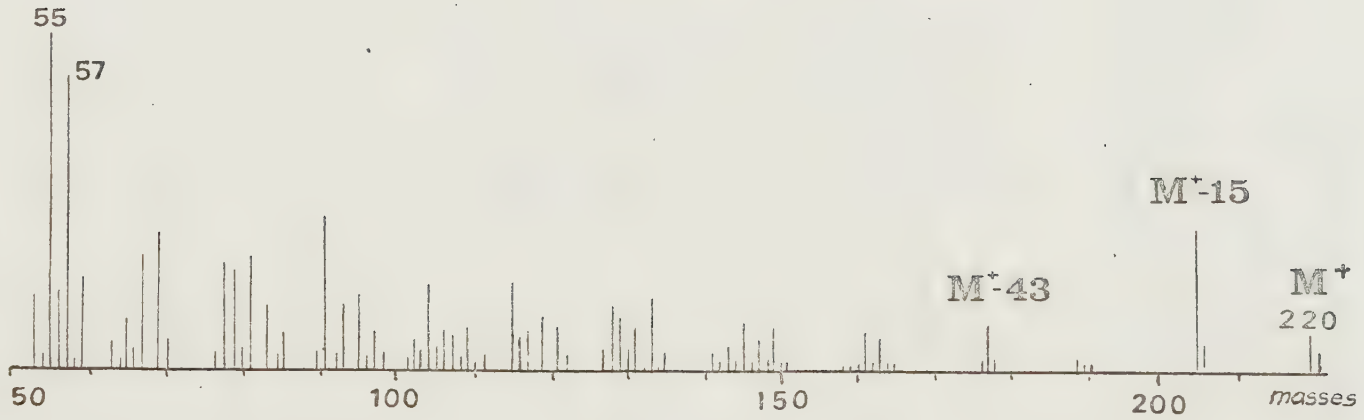
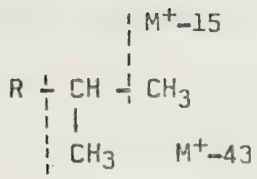


Fig. 21 - Spectre de masse de l'hexadécatriène.



Le composé A est donc un méthyl 2 pentadécatriène ou isohexadécatriène.

IV - CONCLUSIONS

1 - Nous avons mis en évidence dans les levures, comme dans les graines de Corylus, des fractions d'hydrocarbures distinguées par leur comportement vis à vis de solvants tels que l'éther éthylique et le méthanol. Ces deux groupes ont des compositions différentes ; en particulier, on note la présence dans les hydrocarbures "liés" d'un dérivé insaturé ramifié, iso hexadécatriène à des taux de l'ordre de 20 % du total. Le sort de ce composé n'est pas totalement lié à celui du squalène, qui disparaît par culture des levures en aérobiose. Cette différence de composition justifie l'extraction et l'étude séparéesdes deux groupes de carbures.

2 - Les expériences réalisées en présence de métabolites marqués conduisent à des incorporations faibles de l'ordre de 500 dpm/mg. Il n'est donc pas possible d'en tirer des enseignements sur le mode de biosynthèse des hydrocarbures chez Schizosaccharomyces liquefaciens ; plus intéressant est le fait que l'activité dans les hydrocarbures "liés" est supérieure à celle des hydrocarbures libres. On peut en effet supposer que les hydrocarbures synthétisés sont liés par liaison hydrophobe ou interaction de Van der Waals aux lipoprotéines.

3 - Il nous a donc paru intéressant de localiser avec précision les hydrocarbures dans la cellule de levure.

chapitre II

LOCALISATION DES HYDROCARBURES DANS LA CELLULE

I - INTRODUCTION

On peut schématiquement considérer que la cellule de levure est composée d'une solide paroi externe, de la membrane cytoplasmique et du contenu cellulaire.

- Les constituants chimiques responsables de la rigidité de la paroi externe sont des glycanes associés à des protéines, dont certaines ont des propriétés enzymatiques : ainsi l'invertase de S. cerevisiae est extérieure à la membrane plasmique (Sutton et Lampen, 1962). Il semble que les liaisons polysaccharides-protéines soient du type ester. Les taux en lipides sont généralement faibles : 8 % pour S. cerevisiae (Northcote et Horne, 1952).

- La membrane cytoplasmique est de nature lipoprotéique. Elle est caractérisée par des taux importants de lipides et en particulier, de phospholipides. On trouve environ 39 % de lipides dans les membranes cytoplasmiques de S. cerevisiae (Longley, Rose et Knights, 1968) et 40 % dans celles de C. utilis (Garcia-Mendoza et Villanueva, 1967).

- Le contenu cellulaire contient également des membranes (réticulum endoplasmique..) des organites (mitochondries, nucleus...).

Les méthodes utilisées pour la séparation de ces fractions cellulaires impliquent dans un premier temps la destruction des parois cellulaires. Cette destruction peut être obtenue soit par choc (Falcone et Nickerson, 1956), soit par traitement au vibreur de Mickle en présence de poudre de verre (Eddy et Rudin, 1957 ; Deshusses, Berthoud et Posternak, 1969). On peut également digérer la paroi cellulaire par des strepzymes (Garcia-Mendoza et Villanueva, 1967), par la papaïne ou la trypsine (Eddy, 1958). La méthode actuellement la plus usitée est la digestion de la paroi cellulaire par le suc intestinal d'Helix pomatia (Longley, Rose et Knights, 1968). On obtient ainsi les protoplastes qui sont lysés par choc osmotique (Sutton et Lampen, 1962) et libèrent le contenu cellulaire et la membrane cytoplasmique.

C'est par cette technique qu'a été étudiée la localisation des hydrocarbures dans la cellule de levure. On possède encore très peu d'informations sur cette question. Fabre, Baraud et Cassagne (1969) montrent pour la première fois que 80 % des hydrocarbures de Candida utilis se retrouvent dans la membrane cytoplasmique, le reste se partageant à peu près entre le contenu cellulaire et la paroi. Le squalène est uniquement situé dans la membrane cytoplasmique, alors que l'isohexadécatriène est présent à des taux variables dans toutes les fractions. Nous avons tenté d'étendre ces premiers résultats à d'autres levures telles que Torulaspora rosei et Saccharomyces cerevisiae. L'influence du mode de culture (aérobiose ou anaérobiose) sur la composition en hydrocarbures a été envisagée. Dans un dernier point nous avons déterminé le marquage des hydrocarbures dans les différentes parties de la cellule en administrant de l'acétate U-^{14}C à une souche de S. cerevisiae.

II - LOCALISATION DES HYDROCARBURES DANS LES CELLULES DE S. cerevisiae et I. rosei

a) Culture des levures : l'étude a porté sur une souche S_2 de S. cerevisiae des Etablissements Fould-Springer. I. Rosei a été cultivée en anaérobiose pendant 15 jours.

b) Préparation des fractions : les parois cellulaires, les membranes cytoplasmiques et le contenu cellulaire ont été préparés par la méthode de Longley, Rose et Knights (1968) reprise par Fabre, Baraud et Cassagne (1969), Fabre (1969), Baraud, Maurice et Napias (1970) et Napias (1970).

c) Extraction des lipides - Préparation des hydrocarbures :

Les lipides de la paroi externe sont extraits par agitation de la solution pendant 36 h à température ambiante avec un volume égal du mélange $CHCl_3$-CH_3OH 2/1.

Les lipides du contenu cellulaire sont extraits de la même façon, en terminant par un chauffage sous reflux de 30 minutes.

Les lipides des membranes cytoplasmiques sont extraits par chauffage sous reflux successivement du $CHCl_3$, $CHCl_3$ + CH_3OH (2/1), CH_3OH et enfin CH_3OH + HCl 0,7 N.

Les alcanes ont été préparés de la façon précédemment décrite . Des essais préliminaires nous ayant montré que le suc intestinal d'Helix pomatia contient la série complète des hydrocarbures pairs et impairs, nous n'avons pu étudier la fraction contenant les débris de parois cellulaires.

Résultats : les résultats globaux sont portés dans le tableau XXVII.

Tableau XXVII

LOCALISATION des LIPIDES dans les CELLULES de LEVURES

(poids en mg et %)

	S. cerevisiae	T. rosei
	poids en mg	poids en mg
Levure sèche	8.200	16.838
Lipides des membranes	317	780
Lipides du contenu cellulaire	94	224
Hydrocarbures des membranes	14,4	53,2
Hydrocarbures du contenu cellulaire	4,0	20,2
	%	%
Hydrocarbures/levure sèche	0,22	0,43
HC Mb/lipides Mb	4,5	6,8
HC cont. cell./lipides cont. cell.	4,25	7,9
HC Mb/HC totaux	78,3	72,7
HC cont. cell./HC totaux	21,7	27,3

Près de 80 % des hydrocarbures sont localisés dans la membrane protoplastique. Cela est en très bon accord avec les résultats déjà obtenus avec C. utilis . Les taux d'hydrocarbures dans les lipides des membranes et du contenu cellulaire sont du même ordre dans les deux expériences. Une expérience témoin portant sur des levures entières de T. rosei avant fractionnement donne un taux moyen en alcanes de 7,1 % du total des lipides.

d) Etude chromatographique :

Les hydrocarbures ont été analysés par C.P.G. sur colonnes de D.E.G.S et UCC 982 comme déjà décrit. Les résultats sont portés dans le tableau XXVIII.

TableauXXVIII

COMPOSITION EN HYDROCARBURES DES MEMBRANES ET DU CONTENU CELLULAIRE
(en % des hydrocarbures totaux)

Hydrocarbures	S. cerevisiae		T. rosei	
	Membranes	Contenu cellulaire	Membranes	Contenu cellulaire
Alcanes				
C14	-	3,6	-	-
C15	-	4,9	-	-
C16	0,3	5,0	1,1	0,5
C17	0,7	6,6	1,1	-
C18	1,2	2,5	1,4	1,1
C19	1,3	4,8	3,0	0,5
C20	1,7	2,2	t	1,6
C21	2,2	1,5	1,0	3,4
C22	2,6	3,6	2,1	6,8
C23	3,8	3,5	3,1	9,3
C24	5,4	2,8	3,0	10,7
C25	5,3	2,0	2,9	9,5
C26	6,1	2,5	2,9	8,3
C27	3,7	4,3	2,3	6,2
C28	8,5	5,4	2,2	4,5
C29	1,4	4,3	0,3	3,1
C30	1,2	2,2	t	1,5
C31	t	1,0	0,5	-
C32	t	t	t	-
Isoalcanes				
C22	0,3	0,3	0,1	-
C23	0,2	t	0,3	0,1
C24	-	0,1	0,1	0,2
C25	-	-	0,1	0,6
C26	0,2	t	0,2	0,6
C27	0,2	-	0,1	t
C28	0,6	-	0,2	1,0
C29	-	-	t	0,9
Alcènes				
C21	-	0,4	-	-
C22	t	12,7 ?	-	-
C23	-	0,2	-	-
C24	0,1	-	-	-
C25	0,2	0,2	-	-
iso C16:3	32,8	7,3	18,7	25,0
Squalène	20,0	-	53,3	4,7
Non identifiés				
B(24,25)	-	6,7	-	-
C(24,62)	-	9,0	-	-

Dans l'expérience portant sur S. cerevisiae on constate l'existence de tous les alcanes pairs et impairs de C_{14} à C_{32}. Les alcanes ramifiés sont présents à l'état de traces, ainsi que les alcènes. On note dans le contenu cellulaire la présence de deux pics notés B et C, dont les nombres de carbone sur D.E.G.S. à 203° C sont respectivement 24,25 et 24,62. Le squalène représente 20 % du total et l'isohexadécatriène 32,8 % dans les membranes. Ce taux moyen de squalène s'explique par le mode de culture en aérobiose partielle de la souche S_2 de S. cerevisiae. Dans les membranes de T. rosei, cultivée en anaérobiose stricte, le squalène représente 53 % du total et l'hexadécatriène ramifié, 18,7 %. On note également une faible quantité de squalène dans le contenu cellulaire.

III - INCORPORATION D'ACETATE DANS LES HYDROCARBURES DE S. cerevisiae

29,3 g de levures à 67,4 % d'humidité sont mis en suspension dans 37 ml d'eau contenant 120 µC d'acétate U-^{14}C d'activité spécifique 95 mC/mM. Le contact dure 48 h à 30° C, en aérobiose. Après incubation les différentes fractions sont préparées comme précédemment. Les lipides des parois, du contenu cellulaire et des membranes sont extraits. Pour les membranes, les lipides extraits par $CHCl_3$ + CH_3OH 2/1 (notés Mb_1) et ceux extraits par le CH_3OH + HCl 0,7 N (notés Mb_2) ont été étudiés séparément.

Les résultats globaux des mesures d'activité sont portés dans le tableau XXIX.

Tableau XXIX

INCORPORATION D'ACTIVITE dans les LIPIDES des CELLULES de LEVURES

	poids (mg)	dpm	dpm/mg
Lipides Mb_1	340	1.000.000	3.000
Hydrocarbures Mb_1	11,9	5.350	450
Lipides Mb_2	103	274.800	2.655
Hydrocarbures Mb_2	7,7	2.160	280
Lipides du contenu cellulaire	139	45.500	358
Hydrocarbures du contenu cell.	6,1	882	145
Lipides de la paroi cellulaire	-	77.500	-
Hydrocarbures de la paroi cell.	-	1.830	-

Le taux d'hydrocarbures par rapport à la levure sèche (9,580 g) est de 0,27 % tout à fait semblable à celui de l'expérience précédente. Les membranes renferment 76,5 % des hydrocarbures. Nous avons porté dans le tableau les mesure d'activité relatives aux lipides des parois cellulaires. Le suc intestinal d'Helix pomatia contenant des lipides, nous n'avons pas calculé les activités spécifiques des lipides de la paroi. Il y a plusieurs points à remarquer :

a) Les activités spécifiques des hydrocarbures sont identiques à celle obtenues avec des précurseurs ramifiés.

b) 75 % de l'activité totale des hydrocarbures se retrouvent dans la membrane protoplastique. Si l'on considère uniquement les membranes et le contenu cellulaire, les hydrocarbures des membranes incorporent 90 % de l'activité, alors qu'ils représentent en masse 76 % du total.

c) Les taux d'incorporation dans les hydrocarbures sont faibles : ils ne représentent que 0,7 % environ de l'activité des lipides.

Analyse chromatographique :

Les fractions des hydrocarbures du contenu cellulaire et des membranes Mb_1 et Mb_2 ont été analysées par CPG. Les résultats sont portés dans le tableau XXX.

Tableau XXX

COMPOSITION en HYDROCARBURES de S. cerevisiae

Hydrocarbures	Membranes Mb_1	Membranes Mb_2	Contenu cellulaire
Nc 15,25	2,4	8,2	12,5
C16	-	-	-
C17	-	-	-
C18	0,1	0,2	0,1
C19	1,0	0,4	1,8
Nc 19,4	-	-	4,3
C20	1,1	1,7	1,5
C21	2,3	2,0	2,4
Nc 21,4	0,2	0,4	0,2
C22	2,2	2,2	1,9
Nc 22,4	0,1	0,1	0,1
C23	4,6	3,8	3,1
i C24	-	0,1	0,3
C24	7,4	6,0	4,7
i C25	-	-	0,2
C25	13,0	13,4	7,7
C26	13,7	13,2	9,5
i C27	0,9	2,5	-
C27	14,1	12,3	10,9
i C28	0,7	0,8	-
C28	12,1	10,2	12,8
i C29	0,4	0,6	-
C29	10,6	8,3	10,2
i C30	0,7	0,8	-
C30	6,8	6,0	7,5
i C31	-	-	1,4
C31	4,8	4,9	4,0
C32	0,8	1,7	1,4
C33	-	0,2	1,0
C34	-	-	0,5

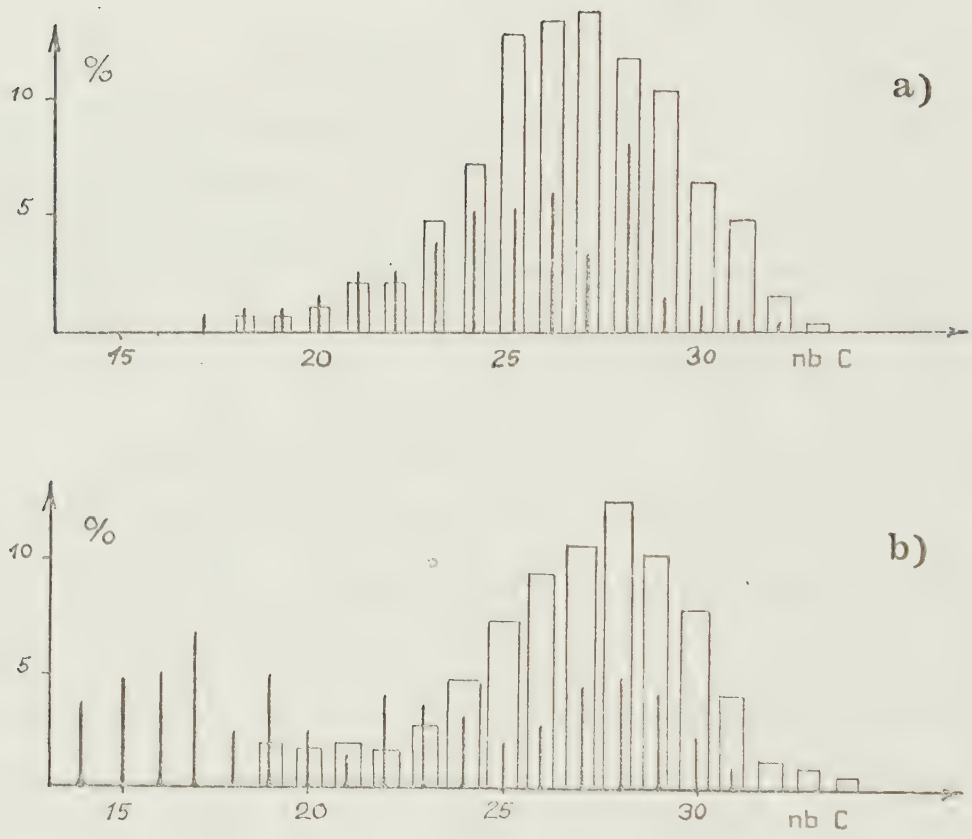


Fig. 22 - Composition en alcanes de Saccharomyces cerevisiae

a) dans les membranes — aérobiose

b) dans le contenu cellulaire — anaérobiose

(en % du total des hydrocarbures).

Le squalène a totalement disparu des membranes en 48 h d'aérobiose. L'isohexadécatriène se trouve à des taux beaucoup plus faibles que précédemment dans les membranes, mais ne varie pas dans le contenu cellulaire. Les alcanes ramifiés sont présents à des taux comparables aux mesures précédentes. Les pics non identifiés du contenu cellulaire (Nc 24,25 et Nc 24,62) ont disparu dans l'expérience en aérobiose.

Discussion des résultats :

1) Sur la figure 22 nous avons porté les taux en hydrocarbures des membranes et du contenu cellulaire de S. cerevisiae cultivée soit en anaérobiose partielle soit en aérobiose ; l'évolution des taux des deux fractions est assez parallèle quand on passe de l'anaérobiose à l'aérobiose : il est possible qu'il y ait des échanges de lipides au sein de la cellule comme ceux montrés par Ben Abdelkader et Mazliak (1970).

2) Le squalène est exclusivement localisé dans les membranes ; il est entièrement dépendant des conditions de culture. Or les stérols sont 20 fois plus abondants dans les membranes que dans le reste de la cellule (Baraud et al. 1970b). De plus lorsque l'on passe de l'anaérobiose à l'aérobiose les stérols libres voient leur taux passer de 27 % à 8,4 % (Napias, 1970). Il est vraisemblable que ces deux phénomènes sont liés. L'isohexadécatriène suit à peu près le sort du squalène dans les membranes, mais dans le contenu cellulaire, son pourcentage est indépendant des conditions.

3) Le résultat le plus intéressant est le fait qu'environ 80 % des hydrocarbures se retrouvent constamment dans les membranes protoplastiques. Ce fait est un peu paradoxal, car on pense généralement que les lipides membranaires

sont essentiellement des phospholipides. Selon Rouser et al. (1969) la présence de lipides neutres dans les membranes est un indice de séparation imparfaite et la présence de triglycérides par exemple est due à des contaminations. Cependant Baraud et al. (1970b) montrent dans les membranes des taux en triglycérides de 7 % le total des lipides neutres (cérides, stérides, diglycérides et triglycérides) représentant plus de 60 % du total. Si l'on rapproche ce résultat de ceux obtenus par extraction directe à l'éther puis au méthanol, on peut penser que les hydrocarbures extraits au méthanol sont en partie ceux des membranes ; les hydrocarbures seraient liés aux phospholipides ou aux restes aliphatiques des aminoacides par liaison hydrophobe ou interaction de Van der Waals. La présence d'un taux considérable d'hydrocarbures montre que les membranes peuvent renfermer des lipides parfaitement neutres, et l'interaction lipides - protéines n'a pas forcément une seule solution.

4) L'examen des marquages confirme cette vue. Les hydrocarbures sont beaucoup plus marqués dans les membranes que dans le reste de la cellule ; on peut rapprocher ce résultat du fait que les hydrocarbures "liés" marqués par l'isobutyrate, la valine ou la leucine sont systématiquement plus marqués que les hydrocarbures "libres". On peut donc supposer que les hydrocarbures sont non seulement localisés essentiellement dans les membranes protoplastiques, mais qu'ils y sont synthétisés.

RESUME ET CONCLUSIONS

Ce mémoire constitue, à notre connaissance, la première étude systématique consacrée aux hydrocarbures des tissus végétaux. Nous avons étudié d'abord ces hydrocarbures dans les graines de Corylus. L'analyse comparative des compositions en acides gras et hydrocarbures en fonction du temps montre qu'il n'y a pratiquement aucune relation entre ces deux séries de composés. Il est possible que le système enzymatique responsable de la synthèse des paraffines soit masqué dans les cotylédons. L'étude des lipides des feuilles de Corylus a permis de montrer qu'à une augmentation des taux en alcanes correspond un accroissement des proportions d'acides gras à très longue chaîne, et ces deux phénomènes peuvent être liés.

Des expériences sur la biosynthèse des alcanes ont alors été réalisées sur A. porrum : l'épiderme et le parenchyme sont des sites de synthèse indépendants, mais dans les cires, les paraffines incorporent 20 % du total de l'activité de la fraction lipidique, alors que ce taux est inférieur à 1 % dans les lipides internes. L'étude de la biosynthèse des hydrocarbures a donc été réalisée sur les lipides des cires épicuticulaires. Les activités spécifiques des acides gras et des hydrocarbures ayant incorporé divers précurseurs, ont été déterminées. Il apparaît que les acides gras à très longue chaîne renferment l'essentiel de l'activité de la fraction des acides et que leurs activités spécifiques sont comparables à celles des hydrocarbures. Un mécanisme rendant compte des phénomènes observés a été proposé. Selon cette hypothèse, le système enzymatique, localisé dans les épidermes, synthétise des acides gras qui sont décarboxylés lorsqu'ils ont une longueur de chaîne suffisante. Les hydrocarbures et les acides gras relâchés du système avant la décarboxylation sont excrétés vers les cires, où ils ne

sont plus réactionnels.

Dans la dernière partie, nous avons envisagé la localisation des hydrocarbures dans la levure, organisme unicellulaire se prêtant bien à cette étude. On a montré tout d'abord qu'il existe deux catégories d'hydrocarbures différencié par leur comportement vis à vis de solvants tels que l'oxyde d'éthyle et le méthanol ; les hydrocarbures extraits en même temps que les lipides polaires peuvent être rattachés aux lipoprotéines. L'étude des lipides des membranes protoplastique et du contenu cellulaire montre que 80 % des hydrocarbures se retrouvent dans les membranes. L'incorporation de précurseurs marqués dans les hydrocarbures est toujours très faible. Mais dans les expériences réalisées les hydrocarbures "liés" ont toujours une activité supérieure aux hydrocarbures "libres", de même l'activité des hydrocarbures des membranes est 4 fois supérieure à celle des hydrocarbures du contenu cellulaire.

Si, comme l'établissent les analyses, les hydrocarbures sont des constituants des membranes, il faut alors les considérer comme des constituants obligatoires des cellules, toutes compartimentées. Le caractère totalement apolaire de ces molécules peut leur faire jouer un rôle structural dans la biosynthèse des membranes. Ces substances longtemps ignorées méritent donc une étude attentive en particulier que leurs mode et site de synthèse soient clairement élucidés. Il semble que l'isolement des systèmes enzymatiques responsables de la synthèse de ces composés puisse apporter la réponse à la plupart des questions encore en suspens.

BIBLIOGRAPHIE

ALBRO P.W., DITTMER J.C. - Biochemistry, 8, 394, 1969a

ALBRO P.W., DITTMER J.C. - Biochemistry, 8, 953, 1969b

ALBRO P.W., DITTMER J.C. - Biochemistry, 8, 1913, 1969c

ALBRO P.W., DITTMER J.C. - Biochemistry, 8, 3317, 1969d

ALBRO P.W., DITTMER J.C. - Cités par P.E. Kolattukudy in Ann. Rev. of Plant Physiol. 21, 163, 1970.

AVIGAN J., MILNE G.W.A., HIGHET R.J. - Biochim. Biophys. Acta, 144, 127, 1967.

BARAUD J., BENITEZ F., GENEVOIS L., MAURICE A. - C.R. Acad. Sci., 260, 7045, 1965.

BARAUD J., CASSAGNE C., GENEVOIS L., JONEAU M. - C.R. Acad. Sci., 265, Série D, 83, 1967.

BARAUD J., DEMASSIEUX S., MAURICE A. - Revue Française des Corps Gras, 12, 155, 1970a.

BARAUD J., MAURICE A., NAPIAS C. - Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 421, 1970b.

BEN ABDELKADER A., MAZLIAK P., - Eur. J. Biochem., 15, 250, 1970.

BEYNON J.H., SAUNDERS R.A., WILLIAMS A.E. - in "The mass spectra of organic molecules", Elsevier Pub. Cy. N.Y., 1968.

BOULTON A.A. - Exp. Cell Research, 37, 343, 1965.

BURR G.O., MILLER E.S. - Bot. Gaz., 99, 773, 1938.

BUTT V.S., BEEVERS H., - in "Plant Physiology" édit. by F.C. STEWARD, Vol. IV B, Acad. Press. N.Y., 265, 1966.

CASSAGNE C., - Thèse de Doctorat en Chimie, Bordeaux 1966.

CASSAGNE C. - J. Agr. Trop. et Bot. Appl., 14, 494, 1967.

CASSAGNE C. - Qual. Plant. Mater. Veg., 17, 235, 1969.

CASSAGNE C. - C.R. Acad. Sci., 270, Série D, 3055, 1970.

CHANNON H.T., CHIBNALL A.C. - Biochem. J., 23, 168, 1929.

CHAPMAN D. - "The Structure of Lipids", Methuen and Co. 1965

CLENSHAW C., SMEDLEY Mc LEAN I., - Biochem. J., 23, 107, 1929.

CROMBIE W.M. - J. Exptl. Bot., 7, 181, 1956.

DEMASSIEUX S. - Thèse de 3ème cycle, Bordeaux 1969.

DESHUSSES J., BERTHOUD S., POSTERNAK Th. - Biochim. Biophys. Acta, 176, 803, 1969.

DOMERCQ S. - Thèse d'Ingénieur-Docteur, Bordeaux 1956.

DOUCE R., FAURE M., MARECHAL J. - C.R. Acad. Sci., 262, 1549, 1966.

DOUGLAS A.G., EGLINTON G. - in "Comparative Phytochemistry", T. SWAIN Ed., Acad. Press, N.Y., 57, 1965.

EDDY A.A., RUDIN A.D. - Proc. Roy. Soc. B., 148, 419, 1957.

EDDY A.A. - Proc. Roy. Soc. B., 149, 425, 1958.

EGLINTON G., HAMILTON R.J. - in "Chemical Plant Taxonomy" T. SWAIN Ed., Acad. Press, N.Y., 187, 1963.

EGLINTON G., HAMILTON R.J. - Science, 156, 1322, 1967.

EVREINOFF V.A. - J. Agr. Trop. et Bot. Appl., 4, 274, 1958.

EVREINOFF V.A. - "Le Noisetier", G.M. PERRIN, Ed., Bibliothèque de l'Arboriculture fruitière, 1961.

EYRE J.V. - Biochem. J., 25, 1902, 1931.

FABRE-JONEAU M., BARAUD J., CASSAGNE C. - C.R. Acad. Sci., 268, série D, 2282, 1969.

FABRE M. - Thèse de Doctorat en Biochimie, Bordeaux 1969.

FALCONE G., NICKERSON W.J. - Science, 124, 272, 1957.

FANG S.C., BULLIS D.E. - J. Amer. Oil Chemist's Soc., 24, 513, 1949.

FEHLER S.W.G., LIGHT R.J. - Biochemistry, 9, 418, 1970.

GARCIA-MENDOZA C., VILLANUEVA J.R. - Biochim. Biophys. Acta, 135, 189, 1967.

GAZZARINI F., NAGY B. - Arch. Biochem. Biophys. 113, 245, 1966.

GELPI E., ORÓ J., SCHNEIDER H.J., BENNETT E.O. - Science, 161, 700, 1968.

GRINDLEY D.N. - J. Sci. Food Agric., 1, 147, 1950.

GÜLZ P.G. - Phytochemistry, 7, 1009, 1968.

HALL D.M., DONALDSON L.A. - Nature, 194, 1196, 1962.

HAWKE J.C., STUMPF P.K. - Plant. Physiol., 40, 1023, 1965.

HOPKINS C.Y., CHISHOLM M.J. - Can. J. Bioch. Phys., 39, 1481, 1961.

JAROLIMEK P., WOLLRAB V., STREIBL M., SORM F. - Chem. and Ind., 8, 237, 1964.

JUNIPER B.E. - J. Linn. Soc. Bot., 367, 413, 1956.

JUNIPER B.E. - New Phytologist, 58, 1, 1959.

KANEDA T. - Biochemistry, 6, 2023, 1967.

KANEDA T. - Biochemistry, 7, 1194, 1968.

KATZ I., KEENEY M. - Biochim. Biophys. Acta, 144, 102, 1967.

KOLATTUKUDY P.E. - Biochemistry, 4, 1844, 1965.

KOLATTUKUDY P.E. - Biochemistry, 5, 2265, 1966.

KOLATTUKUDY P.E. - Phytochemistry, 6, 963, 1967.

KOLATTUKUDY P.E. - Plant Physiology, 43, 1466, 1968a.

KOLATTUKUDY P.E. - Plant Physiology, 43, 1423, 1968b.

KOLATTUKUDY P.E. - Plant Physiology, 43, 375, 1968c.

KOLATTUKUDY P.E. - Science, 159, 498, 1968d.

KOLATTUKUDY P.E. - Ann. Rev. of Plant Physiol., 21, 163, 1970.

KORNBERG A., PRICER W.E. Jr. - J. Biol. Chem., 204, 329, 1953a.

KORNBERG A., PRICER W.E. Jr. - J. Biol. Chem., 204, 345, 1953b.

KRANZ Z.H., LAMBERTON J.A., MURRAY K.E., REDCLIFFE A.H. - Aust. J. Chem. 13, 498, 1960.

LEGLISE P. - C.T.I.F.L., Documents, n° 23, juillet 1969.

LONGLEY R.P., ROSE A.H., KNIGHTS B.A. - Biochem. J. 108, 401, 1968.

LUTZ A. - Rev. Gén. Bot., 76, 309, 1969.

LYNEN F. - Fed. Proc., 20, 941, 1962.

MACEY M.J.K., STUMPF P.K. - Plant Physiol., 43, 1637, 1968.

Mac KILLICAN M.E. - J. Amer. Oil Chemist's Soc., 43, 461, 1966.

MARTIN R.O., STUMPF P.K. - J. Biol. Chem., 234, 2548, 1959.

MATHIS C., OURISSON G. - Phytochemistry 3, 115, 1964.

MATSUDA K. - Thèse, Univ. Arizona, Tucson, 1962.

MAURICE A. - Thèse de Doctorat d'Etat, Bordeaux 1967.

MAZLIAK P. - J. Agr. Trop. et Bot. Appl., 8, 180, 1961.

MAZLIAK P. - Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 1963.

MAZLIAK P. - "Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures", Dunod Ed., Paris 1968.

MAZLIAK P. - Progress in Phytochemistry, 1, 49, 1968b. L. Reinhold et Y. Liwschitz Interscience Pub., N.Y., 1968b.

MAZLIAK P. - Qual. Plant. Mater. Veg., XIX, 1-3, 19, 1969.

METCALFE L.D., SCHMITZ A.A. - Anal. Chem., 33, 363, 1961.

MOLD J.D., MEANS R.E., STEVENS R.K., RUTH J.M. - Biochemistry, 2, 605, 1963.

MOLD J.D., MEANS R.E., STEVENS R.K., RUTH J.M. - Biochemistry, 3, 1293, 1964.

MUELLER E., CARR P.H., LOOMIS W.E. - Amer. J. Bot., 41, 593, 1954.

NAPIAS C. - Thèse de Doctorat en Biochimie, Bordeaux 1970.

NICOLAS H.J., HILTIBRAU R.C., WADKINS C.L. - Arch. Biochem. Biophys., 59, 245, 195

NORTHCOTE D.H., HORNE R.W. - Biochem. J., 51, 232, 1952.

O'CONNOR J.G., BUROW F.H., NORRIS M.S. - Anal. Chem. 34, 82, 1962.

QUACKENBUSH F.W., SIMMONS R.O. - J. Amer. Oil Chemist's Soc., 31, 441, 1954.

RADLER F., HORN D.H.S. - Aust. J. Chem., 18, 1059, 1965.

RADLER F. - Office International de la Vigne et du Vin. 47ème Assemblée Générale, Mayence 4-11 septembre 1967.

ROUSER G., NELSON G.L., FLEISCHER S., SIMON G. - in "Biological Membranes", D. CHAPMAN Ed., Acad. Press, N.Y., 1968.

RYHAGE R.E., STENHAGEN E., HALLGREEN D. - Acta Chim. Scand., 13, 845, 1959.

SCHIEFERSTEIN R.H., LOOMIS W.E. - Plant. Physiol., 31, 240, 1956.

SCHIEFERSTEIN R.H., LOOMIS W.E. - Amer. J. Bot., 46, 625, 1959.

SCHUETTE H.A., CHANG Y., CHANG J. - J. Amer. Chem. Soc., 55, 3333, 1933.

SCHUSTER C.E. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 34, 62, 1936.

SIMMONS R.O., QUACKENBUSH F.W. - J. Amer. Oil Chemist's Soc., 31, 601, 1954 .

SIMS R.P., Mc GREGOR W.G., PLESSERS A.G., MES J.C. - J. Amer. Oil Chemist's Soc., 38, 276, 1961.

SKIPSKI V.P., BARCLAY M., BARCLAY R.K., FETZER V.A., GOOD J.J., ARCHIBALD F.M. - Biochem. J., 104, 340, 1967.

ŠORM F., WOLLRAB V., JAROLIMEK P., STREIBL M. - Chem. and Ind., 1964, 1833.

STRANSKY K., STREIBL M., HEROUT V. - Coll. Czechosl. Chem. Commun., 32, 3213, 196

STRANSKY K., STREIBL M., ŠORM F. - Coll. Czechosl. Chem. Commun., 33, 416, 1968.

STUMPF P.K. - in "Plant Biochemistry" J. BONNER et J.E. VARNER Ed., Acad. Press, N.Y., 334, 1965.

SUTTON D.D., LAMPEN J.O. - Biochim. Biophys. Acta, 56, 303, 1962.

TORNABENE R.G., ORÓ J. - J. Bacteriology, 94, 349, 1967.

UCCIANI E., PASERO J., NAUDET M. - Bull. Soc. Chim., 1209, 1962.

ULRICH R. - "La vie des Fruits", Masson et Cie, 53, 1952.

WALBECQ M. - Thèse de Doctorat de l'Université de Paris, 1966.

WOLFE A.C., PARK J.B., BURREL R.C. - Plant Physiology, 17, 289, 1942.

ZILL L.P., HARMON E.A. - Biochim. Biophys. Acta, 57, 573, 1962.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION — Pages

Introduction 1
Historique 2
Plan de l'étude 10

PREMIERE PARTIE

Chapitre I : Etude de la lipogenèse de diverses variétés de noisetiers 12

I - Définition des fruits prélevés 12

II - Etude de la lipogenèse 15

a) Généralités 15
b) Evolution du poids moyen des fruits en fonction du temps 17
c) Extraction des lipides 17
d) Evolution des teneurs en lipides en fonction du temps 18
e) Conclusions 18

Chapitre II : Etude des acides gras 20

I - Généralités 20

II - Etude des acides gras à maturité 21

a) Mode opératoire et résultats 21
b) Oxydation permangano-periodique 22

III - Cinétique de formation des acides gras 23

a) Résultats 23
b) Examen des résultats 23
c) Discussion et conclusions 25

Chapitre III : Etude des hydrocarbures 27

I - Introduction 27

II - Technique d'étude 27

III - Résultats et Discussion 29
a) Taux d'hydrocarbures 29
b) Composition moléculaire des mélanges d'hydrocarbures 30

Conclusions des chapitres II et III 33

Chapitre IV : Etude des acides gras et des hydrocarbures des feuilles de Corylus .. 35

I - Introduction 35

II - Technique d'étude 37

a) Extraction des lipides 37
b) Préparation des esters méthyliques et de la fraction des hydrocarbures 39
c) Chromatographie en phase gazeuse 40

III - Résultats et discussion 40

Conclusions 43

DEUXIEME PARTIE

Introduction 45

Chapitre I : Etude des acides gras et des hydrocarbures d'A. Porrum 47

I - Extraction des lipides 47

II - Etude des esters méthyliques 48

III - Etude des alcanes 49
a) Séparation des hydrocarbures ramifiés sur tamis moléculaire 50
b) Spectrométrie de masse couplée à la C.P.G. 51

Chapitre II : Mise en évidence des sites de biosynthèse des hydrocarbures 53

I - Introduction 53

II - Cinétique d'incorporation d'acétate 2-^{14}C dans les cires 54

III - Incorporation d'acétate à la lumière et l'obscurité 56

IV - Incorporation d'acétate dans les épidermes isolés 57

V - Incorporation d'acétate dans les feuilles cultivées en milieu stérile 59

Chapitre III : Etude de la biosynthèse des hydrocarbures..... 61

I - Matériel et méthodes..... 62

II - Incorporation d'acétate dans les acides gras et alcanes des cires..... 64

III - Incorporation de propionate dans les acides gras et alcanes des cires..... 67

IV - Incorporation de valine et d'isobutyrate dans les cires..... 70

V - Incorporation d'acétate dans les feuilles cultivées en milieu stérile.. 72

Chapitre IV : Proposition d'un mécanisme de biosynthèse des hydrocarbures..... 73

I - Incorporation d'acétate..... 73

II - Proposition d'un mécanisme..... 75

III - Discussion..... 75

IV - Incorporation de propionate..... 78

V - Incorporation d'isobutyrate..... 79

VI - Excrétion des cires..... 80

Conclusions..... 83

TROISIEME PARTIE

Introduction..... 85

Chapitre I : Etude des hydrocarbures de la levure..... 87

I - Matériel et Méthodes..... 87

a) Milieu de culture..... 87

b) Extraction des lipides..... 88

c) Etude des hydrocarbures..... 89

II - Mise en évidence d'alcanes extractibles au méthanol..... 89

III - Etude de l'incorporation de molécules marquées dans les hydrocarcarbures de Schizosaccharomyces liquefaciens..... 90

a) Mode opératoire..... 90
b) Mesure des activités..... 92
c) Etude chromatographique des hydrocarbures..... 93
d) Etude du composé du nombre de carbone 15,25..... 94

IV - Conclusions..... 95

Chapitre II..... 96

I - Introduction..... 96

II - Localisation des hydrocarbures dans les cellules de S. cerevisiae et T. rosei..... 98

III - Incorporation d'acétate dans les hydrocarbures de S. cerevisiae.....100

RESUME ET CONCLUSIONS.....105

BIBLIOGRAPHIE.....107

Vu et approuvé

Bordeaux, le

Le Président du Conseil Transitoire de Gestion

A. MARCHAND

Vu et permis d'imprimer :

Bordeaux, le

Le Recteur

Président du Conseil de l'Université,

J. BABIN